

NEYLLA TEIXEIRA SENA

**Estudo *in vitro* da atividade antimicrobiana do hipoclorito
de sódio e da clorexidina usados como substâncias
químicas auxiliares frente a biofilmes de espécie única**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da Universidade
Estadual de Campinas, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre
em Clínica Odontológica – Área de
Endodontia**

PIRACICABA

2004

NEYLLA TEIXEIRA SENA

**Estudo *in vitro* da atividade antimicrobiana do hipoclorito
de sódio e da clorexidina usados como substâncias
químicas auxiliares frente a biofilmes de espécie única**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da Universidade
Estadual de Campinas, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre
em Clínica Odontológica – Área de
Endodontia**

**Orientadora: Prof^a Dr^a Brenda Paula Figueiredo
de Almeida Gomes**

Banca examinadora:
Prof^a Dr^a Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes
Prof^a Dr^a Isabel Cristina Froner
Prof Dr Alexandre Augusto Zaia

PIRACICABA
2004

Ficha Catalográfica

Se55a Sena, Neylla Teixeira.
Estudo *in vitro* da atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio e da clorexidina usados como substâncias químicas auxiliares frente a biofilmes de espécie única. / Neylla Teixeira Sena. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2004.
xviii, 165p. : il.
Orientador : Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.
1. Endodontia – Métodos experimentais. 2. Biofilme. 3. Microorganismos. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 17 de Dezembro de 2004, considerou a candidata NEYLLA TEIXEIRA SENA aprovada.

A stylized, cursive signature in black ink, likely belonging to Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.

PROFa. DRa. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES

A stylized, cursive signature in black ink, likely belonging to Label Cristina Froner.

PROFa. DRa. LABEL CRISTINA FRONER

A stylized, cursive signature in black ink, likely belonging to Alexandre Augusto Zaia.

PROF. DR. ALEXANDRE AUGUSTO ZAIA

200513944

Dedico este trabalho a ...

... minha filha, Rachel Sena Simões, luz da minha vida, razão do meu viver.

...minha mãe, Maria Ocimar, pelo amor, dedicação e apoio em mim depositados. Esta conquista também é sua, pois somente com você pude percorrer este longo caminho.

...a todos os meus familiares, em especial a Ronald, Vera, Julia, Glenda, Jansen e Amanda por todos os momentos já vividos.

Agradeço ...

...a Deus, Pai todo poderoso

“Senhor, a ti todo a honra e toda a gloria desta vitória. Quantos momentos de angústia, tristeza e desespero, os quais tu foste o meu confidente, meu amigo e meu refúgio. Mais do que isto, tu foste o caminho e a verdade para esta vitória. Obrigada Senhor”.

Agradeço ...

... a minha Orientadora, Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, pela oportunidade e dedicação profissional. Obrigada por ter sido minha orientadora e grande responsável por esta realização em minha vida.

Agradeço ...

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho, de quem recebi apoio necessário para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr Pedro Luis Rosalen, coordenador geral do curso de pós-graduação da FOP/UNICAMP.

À Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, na qualidade de ex-coordenadora do curso pós-graduação de Clínica Odontológica da FOP/UNICAMP.

Ào Prof. Dr Roger William F. Moreira, na qualidade de coordenador do curso pós-graduação de Clínica Odontológica da FOP/UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Francisco José de Souza Filho, ex-chefe do Departamento de Odontologia Resturadora e ex-coordenador da área de Endodontia da FOP/UNICAMP, pelo exemplo de competência.

Ao Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia, coordenador da área de Endodontia da FOP/UNICAMP, pelo exemplo de competência.

Aos Professores Doutores Alexandre Augusto Zaia, Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Caio Cezar Randi Ferraz, Fabrício Batista Teixeira e Francisco José de Souza Filho, professores da área de Endodontia da FOP/UNICAMP, pelos ensinamentos transmitidos e atenção dispensada sempre que solicitada.

Aos Professores Doutores Luis Valdrighi e Joelis Puppo, ex-professores da área de Endodontia da FOP/UNICAMP, pela atenção dispensada.

Aos meus estimados amigos de curso: Tetis Serejo Saiua, Morgana Eli Vianna, Vanessa Bellocchio Berber, Rogério C. Jacinto, Adriana de Jesus Soares, José Flávio Affonso de Almeida, Juliana Nascimento Santos, Marcelo Orlando Menini, Douglas G. N. Cortez, Fábio R. Dametto, Daniel P. de Oliveira, Helena R. C. Rabbang , Iadasa de Quadros, Ronaldo Rogério Rodrigues e Ericka Tavares Pinheiro.

Aos novos mestrandos Danna Mota Moreira, Maraisa Greggio Delboni, Ana Carolina Machado Rocha Lima e Frederico Canato Martinho.

Um agradecimento especial ao meu amigo Rogério C. Jacinto pela amizade e companheirismo.

À Vanessa Bellocchio Berber pela grande amizade, dedicação e pelas nossas intermináveis conversas durante a realização de nossas pesquisas.

À Danna Mota Moreira pelo companheirismo, alegria e dedicação à Rachel.

A Morgana Eli Vianna pelas incontáveis demonstrações de amizade, dedicação e companheirismo. O meu eterno agradecimento a quem sempre esteve disposto a ajudar em todos os momentos.

Aos meus amigos e ex-alunos do curso de Pós Graduação em Clínica Odontológica área Endodontia: Nilton V. Gomes, Gerson H. Yoshinari, Cicero R. Gadê-Neto, Eduardo D. Gurgel Filho, Ezilmara L. R. Souza, Flaviana Bombarda A. Ferreira.

Aos funcionários da disciplina de Endodontia da FOP/UNICAMP Denize L. de Pinho, Maria Aparecida Buscariol, Rubens Marques Payão, pela convivência e auxílio em meus trabalhos diários.

Ao Adailton dos Santos Lima pela paciência e grande ajuda na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	LISTAS	
	I. Tabelas	01
	II. Figuras	05
	RESUMO	7
	ABSTRACT	9
1	INTRODUÇÃO	11
2.	REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1.	Microbiota da infecção intrarradicular	13
2.2.	Estratégias do tratamento endodôntico	21
2.3.	Hipoclorito de sódio	23
2.3.	Clorexidina	26
2.4.	Métodos de estudo	27
2.5.	O que é biofilme	33
3.	PROPOSIÇÃO	53
4.	MATERIAL E MÉTODOS	55
5.	RESULTADOS	60
6.	DISCUSSÃO	97
7.	CONCLUSÃO	111
	REFERÊNCIAS	113
	ANEXO	133

Lista de Tabelas

- 1.1. **Tabela 1– Atividade antimicrobiana de todas substâncias químicas 58**
auxiliares testadas sob agitação mecânica.
- 1.2. **Tabela 2 – Atividade antimicrobiana de todas substâncias químicas 58**
auxiliares testadas sem agitação mecânica.
- 1.3. **Tabela 3 – Suscetibilidade dos microrganismos testados às 60**
substâncias químicas auxiliares sob agitação mecânica.
- 1.4. **Tabela 4 – Suscetibilidade dos microrganismos testados às 60**
substâncias químicas auxiliares sem agitação mecânica.
- 1.5. **Tabela 5 – Tempo máximo (em segundos) necessário para as 62**
substâncias químicas eliminarem os microrganismos testados sob
agitação mecânica.
- 1.6. **Tabela 6 – Tempo máximo (em segundos) necessário para as 62**
substâncias químicas eliminarem os microrganismos testados sem
agitação mecânica.
- 1.7. **Tabela 7 Suscetibilidade de *P. intermedia* frente às substâncias 63**
químicas testadas - com agitação.
- 1.8. **Tabela 8 – Suscetibilidade de *P. intermedia* frente às substâncias 63**
químicas testadas - sem agitação.
- 1.9. **Tabela 9 – Suscetibilidade de *P. endodontalis* frente às substâncias 64**
químicas testadas - com agitação.
- 1.10. **Tabela 10 – Suscetibilidade de *P. endodontalis* frente às 64**

	substâncias químicas testadas - sem agitação.	
1.11.	Tabela 11 – Suscetibilidade de <i>P. gingivalis</i> frente às substâncias químicas testadas - com agitação.	65
1.12.	Tabela 12 - Suscetibilidade de <i>P. gingivalis</i> frente às substâncias químicas testadas - sem agitação.	65
1.13.	Tabela 13 - Suscetibilidade de <i>F. nucleatum</i> frente às substâncias químicas testadas -com agitação.	66
1.14.	Tabela 14 - Suscetibilidade de <i>F. nucleatum</i> frente às substâncias químicas testadas -sem agitação.	66
1.15.	Tabela 15 - Suscetibilidade de <i>C. albicans</i> frente às substâncias químicas testadas -com agitação.	68
1.16.	Tabela 16 - Suscetibilidade de <i>C. albicans</i> frente às substâncias químicas testadas -sem agitação.	68
1.17.	Tabela 17 - Suscetibilidade de <i>E. faecalis</i> frente às substâncias químicas testadas -com agitação.	70
1.18.	Tabela 18 - Suscetibilidade de <i>E. faecalis</i> frente às substâncias químicas testadas -sem agitação.	70
1.19.	Tabela 19 - Suscetibilidade de <i>S. aureus</i> frente às substâncias químicas testadas -com agitação.	72
1.20.	Tabela 20 - Suscetibilidade de <i>S. aureus</i> frente às substâncias químicas testadas sem agitação.	72
1.21.	Tabela 21. Tempo de sobrevivência máximo e seus respectivos	75

	postos, por substância química e para cada um dos microrganismos, com agitação mecânica.	
1.22.	Tabela 22 - Tempo de sobrevivência máximo e seus respectivos postos (em parêntesis), por substância química e para cada um dos microrganismos, sem agitação mecânica.	75
1.23.	Tabela 23 - Sobrevivência de microrganismos frente a Clorexidina gel 2% com agitação.	77
1.24.	Tabela 24 - Sobrevivência de microrganismos frente a Clorexidina líquida 2% com agitação.	78
1.25.	Tabela 25 - Sobrevivência de microrganismos frente ao NaOCl 2,5% com agitação.	79
1.26.	Tabela 26 - Sobrevivência de microrganismos frente ao NaOCl 5,25% com agitação.	80
1.27.	Tabela 27 - Médias, desvios padrões e medianas, para cada substância química testada, com agitação.	81
1.28.	Tabela 28 - Sobrevivência de microrganismos frente a Clorexidina gel 2% sem agitação.	85
1.29.	Tabela 29 - Sobrevivência de microrganismos frente a Clorexidina líquida 2% sem agitação.	86
1.30.	Tabela 30 - Sobrevivência de microrganismos frente ao NaOCl 2,5% sem agitação.	87
1.31.	Tabela 31 - Sobrevivência de microrganismos frente ao NaOCl	88

5,25% sem agitação.

1.32. Tabela 32 - Médias, desvios padrões e medianas, para cada substância química testada, sem agitação.

89

Lista de Figuras

2.1.	Fig. 1 - Formação de biofilme na parede dentinária.	31
2.2.	Fig. 2 - Modelo de desenvolvimento do biofilme.	34
2.3a.	Fig. 3a -Formação do biofilme: colonização primária.	35
2.3b	Fig. 3b - Formação do biofilme: crescimento celular, divisão e produção de polissacarídeo extracelular.	36
2.3c	Fig. 3c - Coadesão de células individuais, coagregadas e grupo de células.	39
2.3d.	Fig. 3d – Maturação do biofilme e formação de mosaico clonal	41
2.4	Fig. 4 – Metodologia: biofilme	56
2.5	Fig.5 – Funções de sobrevivência – com agitação mecânica	82
2.6	Fig.6 – Gráfico de Hazard – com agitação mecânica	83
2.7	Fig.7 – Funções de sobrevivência – sem agitação mecânica	91
2.8	Fig.8 – Gráfico de Hazard – com agitação mecânica	93

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar a atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5% e 5,25% e da clorexidina (CLX) 2.0% tanto na forma gel como líquida utilizados como substância química auxiliar durante o preparo químico- mecânico frente a biofilmes de espécies única. Biofilmes simples dos microrganismos *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Candida albicans* foram formados em filtros de membrana de nitrato de celulose sobre placas de agar sangue. Os biofilmes foram imersos nas substâncias químicas por 30 s, 5, 10, 15, 30 e 60 min com ou sem agitação mecânica e em seguida transferidos para meios de cultura contendo neutralizadores das substâncias químicas. A seguir, foram realizadas diluições em série, alíquotas foram inoculadas em placas de agar sangue, incubadas e após crescimento, as unidades formadoras de colônias foram quantificadas através de suas diluições. O hipoclorito de sódio (NaOCl) 5,25% eliminou todos microrganismos testados em 30 segundos de contato. Frente aos microrganismos anaeróbios estritos, todas as substâncias químicas obtiveram o mesmo desempenho, sendo efetivas em 30 segundos. A solução salina permitiu o crescimento microbiano de todas as cepas. Concluiu-se que NaOCl a 5,25% foi a substância química testada mais efetiva, seguido pela CLX líquida 2%. Os resultados demonstraram que a efetividade do agente antimicrobiano depende dos microrganismos que constituem o biofilme, do tempo de contato destes com o a substância química, da ação ou não da agitação mecânica e forma de apresentação da substância.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the antimicrobial activity of 2.5% and 5.25% sodium hypochlorite and 2.0% chlorhexidine gel and liquid as auxiliary chemical substances against selected single-species biofilms. *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Fusobacterium nucleatum* and *Candida albicans* were grown on cellulose nitrate membrane placed on agar medium, generating single biofilms, which were immersed in the endodontic auxiliary chemical substance for 30 second and 5, 10, 15, 30, and 60 minutes with mechanical agitation or not. Sterile saline was used as a control group. After each time tested, the antimicrobial activity was neutralized. The microorganisms were suspended using a vortex, which was ten-fold serially diluted. Aliquots of the dilutions were plated on 5% sheep blood agar media, and incubated. Colony-forming units were then calculated. NaOCl 5.25% was observed to eliminate all strains in 30 seconds. However, other irrigating solutions showed effective antimicrobial activity against the anaerobic microorganisms in 30 seconds. Sterile saline showed microbial growth in all tested times. NaOCl 5.25% followed by 2% liquid chlorhexidine, was the most effective agents tested. These results indicate that the effectiveness of an antimicrobial agent is closely related to the organization of microorganisms in the biofilm as well as to the contact time between microorganisms and substances, presence or lack of the mechanical agitation, and presentation form of the substances.

1. INTRODUÇÃO

Microrganismos são considerados agentes etiológicos primários no desenvolvimento das necroses pulpares e lesões periapicais e os grandes responsáveis pelo insucesso do tratamento endodôntico (Nair *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 1992; Gomes *et al.*, 1996a e 2004; Siqueira Jr, 2001). Um dos mais importantes passos para o sucesso do tratamento endodôntico consiste na eliminação de microrganismos e seus subprodutos do interior do sistema de canais radiculares (Gomes *et al.*, 1996b).

Jung *et al.* (2000) relataram que mais de 500 espécies foram encontradas na cavidade oral e, destas, aproximadamente 200 espécies foram identificadas do interior do sistema de canais radiculares, das quais as anaeróbias facultativas são as mais resistentes às substâncias auxiliares durante o preparo químico-mecânico (Sundqvist *et al.*, 1998; Molander *et al.*, 1999; Siqueira, 2002; Gomes *et al.*, 2004).

A instrumentação mecânica realizada sem o auxílio de uma substância química auxiliar com poder antimicrobiano é insuficiente na eliminação efetiva dos microrganismos, seus subprodutos e substratos orgânicos (Ingle & Zeldow, 1958; Byström & Sundqvist, 1981). Apesar da efetividade dos agentes antimicrobianos, alguns gêneros microbianos têm se mostrado resistente à terapia permanecendo viáveis no interior do sistema de canais radiculares (Byström & Sundqvist, 1983; Gomes *et al.*, 1996b; Molander *et al.*, 1999). Segundo Spratt *et al.* (2001) os

gêneros bacterianos implicados com o insucesso são: *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Fusobacterium*, *Enterococcus*, *Peptostreptococcus* e *Lactobacillus*.

Uma grande variedade de metodologias tem sido utilizada para testar a efetividade de agentes antimicrobianos em laboratório. Muitas vezes, os resultados mostram-se conflitantes em trabalhos que utilizaram as mesmas substâncias, os mesmos microrganismos e metodologias diferentes. A maioria dos testes utiliza microrganismos planctônicos, ou seja, microrganismos que se apresentam na forma livre e não organizados em biofilme.

Biofilme é uma comunidade estruturada de células bacterianas envoltas por uma matriz polissacarídica produzida e aderidas a uma superfície viva ou inerte (Costerton *et al.*, 1999). As células que fazem parte da estrutura do biofilme diferem fenotipicamente daquelas planctônicas, pois são menos suscetíveis às substâncias antimicrobianas (Wilson 1996).

A proposta deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de substâncias químicas auxiliares utilizadas durante o preparo químico-mecânico frente a biofilmes de espécie única formado por microrganismos e por uma levedura possível de ser encontrado no interior do sistema de canais radiculares.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Microbiota da infecção intrarradicular

No final do século XIX a endodontia era realizada de forma empírica, pois não se conhecia o papel dos microrganismos na indução e perpetuação das alterações da polpa e dos tecidos perirradiculares. O primeiro estudo microbiológico em endodontia data-se de 1894, quando Miller após a análise de material coletado do interior de canais radiculares fez a correlação entre bactérias e patologias pulpares e periapicais. Através do estudo clássico da literatura endodôntica Kakehashi *et al.*, em 1965, confirmaram a importância das bactérias no desenvolvimento das doenças pulpares e perirradiculares expondo a polpa dental de ratos convencionais e “germ-free” à cavidade oral, observando a formação de necrose pulpar e lesão perirradicular somente em ratos convencionais.

Estudos microbiológicos realizados até a metade da década de 70 demonstravam um predomínio de bactérias facultativas, entre as quais as espécies mais comumente isoladas eram: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* e enterococos. No entanto, com o advento de técnicas para o cultivo de microrganismos anaeróbios estritos, Sundqvist, em 1976, revolucionou os conceitos existentes na época. Ele avaliou 32 dentes hígidos que apresentavam polpa necrótica causada por injúria. Dos 19 dentes que apresentavam lesões periapicais comprovadas através de exames radiográficos, 18 continham bactérias, confirmando a importância dos

microrganismos na etiopatogenia das lesões pulpares. Esta importância foi confirmada através do trabalho realizado por Möller *et al.*, em 1981, onde demonstraram que polpas desvitalizadas de macacos que não sofriam contaminação bacteriana não apresentavam mudanças na região periapical.

Atualmente, cerca de 500 espécies foram isoladas na cavidade oral humana. Em princípio, todas essas espécies têm a possibilidade de atingir o sistema de canais radiculares e potencial de serem patógenos endodônticos (Jung *et al.*, 2000). Porém somente cerca de 200 espécies foram identificadas do interior do sistema de canais radiculares e usualmente em combinações de quatro a sete espécies, com grande prevalência de anaeróbios estritos (Sundqvist *et al.*, 1992; Gomes *et al.*, 1996a; Lopes & Siqueira, 1999; Jung *et al.*, 2000; Siqueira, 2002; Gomes *et al.*, 2004).

Muitos são os indicativos para que haja esta seleção na microbiota endodôntica, tais como: fatores nutricionais, baixo potencial de oxido redução, pH, temperatura, interações positivas, antagonismos entre os microrganismos e os mecanismos de defesa do hospedeiro (Marsh & Martin, 1992; Gomes *et al.*, 1996b).

Os nutrientes existentes no interior do canal radicular são provenientes dos fluidos teciduais e da desintegração de células e componentes do tecido conjuntivo, e a sua disponibilidade é um fator de influência na composição da microbiota nas infecções endodônticas (Sundqvist, 1992). A presença de nutrientes como carboidratos, glicoproteínas, aminoácidos e proteínas respaldam as mudanças graduais da microbiota sacarolítica presente no início da infecção

para microrganismos proteolíticos, com o predomínio de espécies dos gêneros *Prevotella*, *Eubacterium*, *Porphyromonas* e *Fusobacterium*. Numa fase tardia, com o aumento da fermentação de aminoácidos e peptídeos para a obtenção de energia, ocorre um predomínio de *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Eubacterium* e *F. nucleatum*. Após o término das fontes nutricionais existentes nos fluidos teciduais, bactérias que hidrolisam proteínas como *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp. e *Actinomyces* spp., assumem papel importante nas infecções mistas fornecendo peptídeos utilizados por espécies dos gêneros *Eubacterium* e *Fusobacterium*, que não possuem a capacidade de clivagem de proteínas (Jansen & Van der Hoeven, 1997; Lopes & Siqueira, 1999).

A concentração de oxigênio no interior do canal é determinante na composição da microbiota. Na fase inicial, em que o oxigênio está presente em grande quantidade nos tecidos oriundos da microcirculação e da exposição à cavidade oral ocorre uma prevalência de bactérias facultativas. Paralelo ao início da instalação da necrose tecidual, tem-se uma redução de sua presença nos tecidos ocasionados pela falta da microcirculação. Com isso, ocorre o desenvolvimento de um meio adequado ao desenvolvimento de anaeróbios estritos pelo seu baixo potencial de óxido-redução (Gomes, 1995; Lopes & Siqueira, 1999).

Relações ecológicas, que ocorrem entre espécies que invadem o sistema de canais radiculares, podem influenciar no estabelecimento da microbiota infectante. As associações podem ser consideradas positivas, quando ambas as

espécies são beneficiadas com a relação; ou negativas quando for inibitório para uma ou para ambos (Gomes *et al.*, 1994a, 1996a; Siqueira, 1997).

Exemplo de relação positiva é encontrado entre os bacilos produtores de pigmentos negros (BPPN) e os gêneros *Campylobacter* e *Veillonella*. O *Campylobacter* spp tem como subproduto metabólico à produção de hemina e a *Veillonella* spp a vitamina K (menadiona), que são necessários na nutrição dos BPPN, tais como: *Prevotella* spp, *Porphyromonas* spp. *Fusobacterium*, *Eubacterium* e *Peptostreptococcus* spp produzem succinato, que pode substituir a hemina ou vitamina K como fator de crescimento dos BPPN (Mayrand & McBride, 1980; Gomes *et al.*, 1994b e 1996a).

Algumas interações negativas também são encontradas entre espécies, onde subprodutos podem agir como toxinas. Como exemplo, pode-se citar interação negativa entre *Streptococcus sanguis*, que produzem bacteriocina, fator inibitório do crescimento de bactérias anaeróbias estritas e CO₂-dependentes. (Sundqvist, 1992a; Gomes *et al.*, 1994b; Gomes, 2002).

O pH tecidual também é um fator limitante na instalação da microbiota. O pH do tecido sadio gira em torno de 7.2 e 7.4, tornando o meio incompatível para a ação das enzimas bacterianas. Contudo nos tecidos necrosados pH varia entre 6 e 7.0 propício para a sobrevivência da maioria das espécies bacterianas (Tronstad *et al.*, 1990).

Os microrganismos mais comumente isolados dos canais radiculares são os facultativos *Streptococcus* e as espécies relacionadas tais como *Enterococcus* e *Gemella*. Das espécies anaeróbias estritas, tais como *Peptostreptococcus*,

Bacteroides, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Veillonella* e *Capnocytophaga* spp também são encontrados em número significativo no interior dos canais radiculares (Morse 1987; Sundqvist, 1994).

Sundqvist (1994) isolou *Fusobacterium nucleatum* em 48% dos casos de canais com polpa necrosada, sendo a espécie encontrada em maior prevalência. Siqueira *et al.*, (1995) relataram a associação deste microrganismo à persistência de sintomas durante o tratamento endodôntico. Heimdahl *et al.*, (1985) relataram a associação do *F. nucleatum* com infecções perirradiculares severas.

Os Bacilos produtores de pigmento negro (BPPN) foram isolados primeiramente em 1921 por Oliver e Wherry. Estes bacilos anaeróbios estritos Gram-negativos podem ser isolados de diversas regiões como: cavidade oral, urina, fezes, trato respiratório e infecções pós-cirúrgicas, em humanos. Após o cultivo, BPPN formavam colônias pigmentadas de negro, sendo consideradas erroneamente como melanina, levando estes pesquisadores a denominarem estes microrganismos de *Bacteroides melaninogenicus* (Mayrand & Holt, 1988).

Por volta de 1970, tornou-se evidente a heterogeneidade entre as cepas de *B. melaninogenicus*, mostrando a necessidade da divisão desta espécie em subespécies. Esta divisão foi baseada em suas propriedades de fermentação. Cepas bacterianas sacarolíticas foram classificadas em dois grupos: *Bacteroides melaninogenicus*, subespécie *melaninogenicus* com grande capacidade de fermentação; e *B. melaninogenicus*, subespécie *intermedius*, com capacidade limitada de fermentação. As cepas assacarolíticas foram agrupadas na subespécie

asaccharolytica (Mayrand & Holt, 1988). Estudos das características bioquímicas e genéticas realizados em 1977 elevaram as subespécies existentes ao nível de espécies e evidenciaram a heterogeneidade entre as cepas de *Bacteroides*. Como consequência, outras espécies foram descritas: *Bacteroides gingivalis* e *Bacteroides endodontalis*.

Em 1988, Shah e Collins (1988) propuseram a reclassificação do grupo assacarolítico em um novo gênero: *Porphyromonas* (*porphyreos*: púrpura; *monas*: unidade – relativa à coloração do pigmento produzido por esses microrganismos), compreendendo três espécies: *Porphyromonas asaccharolytica*, *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas endodontalis*. Em seguida, as cepas sacarolíticas foram reclassificadas em um novo gênero: *Prevotella*, em homenagem a Prévot, microbiologista francês, sendo composto por sete espécies: *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella tannerae*, *Prevotella loescheii*, *Prevotella denticola*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Prevotella corporis* (Shah & Collins, 1990).

Porphyromonas e *Prevotella* spp são encontradas em cerca de 50% das infecções endodônticas, estando relacionada na maioria das vezes com a sintomatologia dolorosa, formação de fístula e odor fétido (Haapasalo *et al.*, 1986; Gomes *et al.*, 2004).

Sundqvist *et al.* (1989) reportaram a presença de BPPN em cerca de 30% dos canais radiculares e que a presença de *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, e *P. intermedia* em infecções mistas é essencial para o desenvolvimento de inflamações perirradiculares purulentas.

Gomes *et al.*, (1994b) relataram que dentes infectados e sintomáticos apresentavam uma associação positiva entre *Peptostreptococcus* spp e *Prevotella* spp.

Enterococcus faecalis, são cocos facultativos anaeróbios Gram-positivos, responsáveis por cerca de 80-90% de infecções enterococais em humanos (Ruoff *et al.*, 1990), sendo a espécie de enterococos mais prevalente nos canais radiculares (Molander *et al.*, 1998, Sundqvist *et al.*, 1998).

Enterococcus faecalis produzem elastase, proteases e hemolisinas que são fatores de virulência que possuem papéis relevantes na patogênese das periodontites. Além destes fatores, várias cepas podem produzir beta-lactamase, tornando-os capazes de causar infecções difíceis de serem tratadas (Rams *et al.*, 1992; Sundqvist, 1992).

Love (2001) demonstrou que a habilidade do *E. faecalis* em causar doenças periapicais e insucessos em dentes tratados endodonticamente é devido a sua capacidade de invadir túbulos dentinários e de permanecer viável no seu interior. Estes fatos indicam o seu papel no desenvolvimento das lesões periapicais resistentes (Gomes *et al.*, 1996b; Siren *et al.*, 1997; Gome *et al.*, 2001; Love, 2001) e sua associação com o insucesso do tratamento endodôntico (Sundqvist *et al.*, 1998; Dahlén *et al.*, 2000; Love, 2001; Peciulene *et al.*, 2001 e 2002).

Investigações microbiológicas e estudos de microscopia eletrônica de varredura têm correlacionado a presença de fungos, especialmente da espécie *Candida albicans* ao insucesso do tratamento endodontico (Nair *et al.*, 1990, Walimo *et al.*, 1997 e 1999). O mecanismo de virulência utilizado para promoção

da colonização do canal radicular está relacionado com sua capacidade de adaptação a variações ambientais, adesão a várias superfícies, produção de enzimas hidrolíticas, transição morfológica, formação de biofilme, e invasão e imuno-modulação das células de defesa. (Hagihara *et al.*, 1988; Ferguson *et al.*, 2002; Siqueira & Sen, 2004; Radcliffe *et al.*, 2004).

Usando microscópio eletrônico de varredura, Nair *et al.*, (1990) analisaram nove casos de periodontite apical resistente e relataram a presença de *C. albicans* em dois casos. Najzar-Fleger *et al.*, (1992) estudando a prevalência de *C. albicans* na cavidade oral relataram sua presença em 55% dos canais radiculares estudados.

Avaliando a prevalência de leveduras na saliva e canais radiculares de dentes associados a periodontites apicais, Egan *et al.*, (2002) demonstraram em seu estudo que a presença de leveduras no interior do sistema de canais não é muito freqüente (em torno de 10%), mas diretamente associada com a sua presença na saliva.

Staphylococcus aureus são cocos Gram-positivos, catalase positiva, similares a cachos de uvas. São patógenos em potencial, estando presentes na nasofaringe de até 40% dos indivíduos, de onde podem alcançar a cavidade oral. *S. aureus* não possuem um papel significativo nas infecções orais e endodônticas, podendo estar relacionados a infecções associadas a feridas cirúrgicas. É questionável se realmente este microrganismo é recuperado do sistema de canais ou se são contaminantes externos (Myers *et al.*, 1969). São associados com

abscesso dental, abscessos associados à implantes ósseo-integrado e osteomielite. Assim como, ao com insucesso do tratamento endodôntico (Goldman & Pearson, 1969) e a resistência a irrigantes endodônticos (Weine, 1991).

2.2. Estratégias do tratamento endodôntico

A erradicação da infecção polimicrobiana presente no interior do sistema de canais radiculares é o principal objetivo na terapia endodôntica (Gomes *et al.*, 1996b). Microrganismos presentes no interior dos canais radiculares não podem ser alcançados pelas células de defesa do organismo, necessitando uma técnica efetiva de instrumentação associada a uma substância química auxiliar com comprovada ação antimicrobiana (Bystron & Sundqvist, 1983; Trostand *et al.*, 1990; Leonardo *et al.*, 2001; Ferraz *et al.*, 2001; Vianna *et al.*, 2004).

Para Siqueira (2001) as chances de que um tratamento endodôntico tenha resultado positivo está diretamente relacionado à eliminação da infecção antes da obturação do sistema de canais radiculares. Heling & Shapira (1978) e Sjogren *et al.*, (1997) mostraram uma taxa de sucesso superior a 20% quando cultura negativa era obtida antes de realização da obturação do sistema de canais radiculares.

O preparo químico-mecânico tem como objetivo promover a limpeza e a modelagem do canal radicular através do uso de instrumentos endodônticos, de substâncias químicas auxiliares e da irrigação-aspiração. Estudos têm demonstrado que a instrumentação quando realizada sem o auxílio de uma

substância química auxiliar com poder microbiano, não consegue reduzir a carga bacteriana efetivamente ou definitivamente (Ingle & Zeldow, 1958; Byström & Sundqvist, 1981; Almyroudi *et al.*, 2002).

As substâncias químicas auxiliares necessitam ser eficaz em todo o complexo que envolve o sistema de canais radiculares, tais como túbulos dentinários, ramificações apicais, cemento e áreas de reabsorção radicular (Sen *et al.*, 1999; Leonardo *et al.*, 2001; Öncag *et al.*, 2003). Para isso, as substâncias químicas necessitam ter ação antimicrobiana e capacidade de dissolução (Byström & Sundqvist, 1985; Cheung & Stock, 1993) ou remoção de tecido orgânico (Ferraz *et al.*, 2001).

As substâncias comumente utilizadas na endodontia são classificadas como: 1) compostos halogenados, representados pelas soluções de hipoclorito de sódio em suas várias concentrações; 2) tensoativos aniônicos, que são: lauril sulfato de sódio (texapon) e lauril dietileno glicol éter sulfato de sódio (tergentol); 3) tensoativos catiônicos, que são: cetavlon (brometo de cetiltrimetilamônio), dehyquart A (cloreto de cetiltrimetilamônio), biosept (cloreto de cetil piridino), zefirol (cloreto de benzalcônio); 4) tensoativos neutros: tween 80; 5) quelantes: EDTA e salvizol (tensoativo quelante); 6) ácidos: ácidos cítricos; 7) peróxidos: peróxido de hidrogênio e peróxido de uréia; 8) associações e/ou misturas: detergente aniônico + hipoclorito de sódio, detergente aniônico + nitrofurazona (tergentol/furacin), detergente aniônico + hidróxido de cálcio (irrigocal e tergidrox), detergente aniônico + EDTA, hipoclorito de sódio alternado com peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio + ácido cítrico, detergente catiônico + EDTA,

peróxido de uréia + EDTA + carbowax (RCprep) neutralizado com hipoclorito de sódio a 5%, peróxido de uréia + tween 80 + carbowax (RPPC) neutralizado com solução de Dakin; 8) soluções: água destilada, soro fisiológico, água com hidróxido de cálcio e clorexidina (Pécora *et al.*, 1999; Vianna, 2002).

2.2.1. Hipoclorito de sódio (NaOCl)

O hipoclorito, em suas várias concentrações, é um composto halogenado e tem o seu primeiro uso registrado em 1792 com o nome de “água de Javele”. Este produto era obtido através da mistura de hipoclorito de sódio e potássio. Em 1820, Labarraque obteve o hipoclorito de sódio a uma concentração de 2,5% de cloro ativo. Esta solução era utilizada como desinfetante de feridas. Em 1915, durante a primeira guerra mundial, Dakin propôs uma nova concentração para a solução de hipoclorito de sódio (0,5%) associada a sua neutralização com ácido bórico para o tratamento das feridas dos soldados. Segundo Dakin, as feridas tratadas com o hipoclorito de sódio a 2,5% demoravam a cicatrizar devido ao alto teor de hidróxido de sódio presente na solução (Dakin, 1915; Hauman & Love, 2003).

Somente em 1936, Walker introduziu o uso do hipoclorito de sódio (NaOCl) na Endodontia. Desde então, o NaOCl, em diferentes concentrações, tornou-se a solução auxiliar da instrumentação mais utilizada na terapia endodôntica (Siqueira, 1997).

O NaOCl apresenta excelente atividade antimicrobiana frente a microbiota endodôntica (Byström & Sundqvist, 1983; Foley *et al.*, 1983; Hauman & Love,

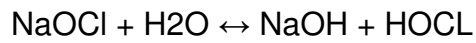
2003). Sua ação antimicrobiana está relacionada com a formação de compostos contendo cloro ativo, como o ácido hipocloroso e o íon hipoclorito (Lopes & Siqueira, 1999).

O cloro ativo, liberado pelo ácido hipocloroso, ao entrar em contato com as proteínas tissulares, forma nitrogênio, formaldeído e acetaldeído. Como consequência ocorre a quebra da cadeia de peptídios resultando na dissolução das proteínas. Durante este processo, hidrogênio do grupamento amina (-HN) é substituída por cloro (-NCL) formando cloraminas, compostos de alta toxicidade, os quais interferem no metabolismo celular (Estrela, 2000; Hauman & Love, 2003).

Algumas enzimas bacterianas possuem cadeias laterais que terminam em grupamentos sulfidril (SH). Essas enzimas somente exercem suas funções quando este grupamento se encontra livre e reduzido. O cloro age promovendo a oxidação irreversível do grupamento sulfidril causando inativação das enzimas essenciais e conseqüentemente a morte celular (Estrela, 2000; Hauman & Love, 2003).

Infecções causadas por bactérias anaeróbias geralmente produzem odor fétido devido à produção de ácidos graxos de cadeia curta, compostos sulfurados, amônia e polaminas (Gomes *et al.*, 1996a). O cloro através da sua atividade letal sobre os microrganismos e ação oxidativa sobre os produtos bacterianos possui poder desodorizante.

A capacidade solvente tecidual do hipoclorito de sódio é atribuída ao hidróxido de sódio oriundo da reação do NaOCl com água, demonstrada pela seguinte reação química:



Hipoclorito de sódio + água \leftrightarrow hidróxido de sódio + ácido hipocloroso.

O NaOH promove a hidrólise das proteínas convertendo-as em aminoácidos, e a dos lipídios em ácidos graxos livres, que são solúveis e facilmente removidos do interior do canal radicular (Abou-Rass & Piccinino, 1982; Baumgartner & Cuenin, 1992; Vianna, 2002).

O hipoclorito de sódio apresenta capacidade de dissolução tecidual tanto em tecido vital, quanto em necrosado, sendo sua ação influenciada pelo pH e a concentração da solução. Grossman & Meiman, em 1941, demonstraram que a soda clorada é capaz de dissolver o tecido pulpar em menos de duas horas. Abou-Rass & Oglesby, em 1981, avaliaram a capacidade solvente do NaOCl e os efeitos causados pela temperatura, concentração e o tipo de tecido e concluíram que quanto mais alta a temperatura e a concentração maior é a dissolução tecidual (Lopes & Siqueira, 1999; Hauman & Love, 2003).

Como consequência das propriedades de dissolução tecidual e atividade antimicrobiana, o NaOCl é altamente tóxico em altas concentrações causando danos ao tecido periapical quando em contato com o mesmo. Estes danos são causados pelo seu efeito oxidativo aos tecidos vitais da região periapical (Spangberg *et al.*, 1973; Becking, 1991; Hülsmann & Hahn, 2000; Ferraz *et al.*, 2001). Outras características negativas são o odor e gosto desagradáveis, tendência a manchar roupas, potencial corrosivo (Neal *et al.*, 1983; Baumgartner & Cuenin, 1992) e capacidade de causar reações alérgicas (Kaufman & Keila, 1989).

2.2.2. Clorexidina

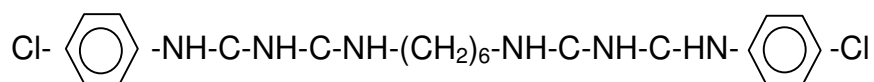
A clorexidina foi introduzida na medicina em 1950 como desinfetante de amplo espectro bacteriano e, em 1954 iniciou a ser empregada rotineiramente no tratamento de feridas na pele (Fidel *et al.*, 1995). Os primeiros estudos realizados na odontologia utilizaram a clorexidina na desinfecção de campos operatórios (Cawson & Curson, 1959). Na dentística tem sido largamente utilizada, demonstrando excelentes resultados no controle da cárie pela redução de *Streptococcus mutans* e espécies de *Lactobacillus* (Bondestam *et al.*, 1996; Ferraz *et al.*, 2001) Na periodontia atua como auxiliar no tratamento controlando o crescimento de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos (Bondestam *et al.*, 1996; Ferraz *et al.*, 2001), e na prevenção da formação da placa bacteriana pela capacidade de aderir a substratos aniônicos como hidroxiapatita, películas, glicoproteínas salivares e bactérias, e pela sua lenta liberação dos sítios de retenção (Greenstein *et al.*, 1985).

Na endodontia, a clorexidina tem sido utilizada como substância química auxiliar e medicação intracanal (Jeansonne & White, 1994, Siqueira & Uzeda 1997; Ferraz *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2001e 2003). A clorexidina é efetiva contra um grande número de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, leveduras, anaeróbios facultativos, e aeróbios (Fardal & Turnbull, 1986; Ferraz *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2001e 2003).

Estudos têm demonstrado que ela possui efeito inibitório nas bactérias comumente encontradas nas infecções endodônticas, através da ligação com a

parede celular microbiana, alterando o equilíbrio osmótico. Em baixas concentrações, substâncias de baixo peso molecular, como fósforo e potássio, tendem a migrar para fora da célula (Fardal & Turnbull, 1986). Em maior concentração, ocorre a precipitação do conteúdo citoplasmático da célula resultando na sua morte (Fardal & Turnbull, 1986; Cervone *et al.*, 1990), efeito residual (White *et al.*, 1997; Komorowsky *et al.*, 2000), e baixa citotoxicidade (Tanomaru *et al.*, 2002).

A clorexidina é uma base forte estabilizada na forma de sal e é formada estruturalmente por moléculas catiônicas que consistem de dois anéis de 4-clorofenol e dois grupos biguanidina conectados a uma cadeia central de hexametileno:



2.3. Métodos de Estudo

O estudo dos microrganismos predominantes nas infecções bucais depende de vários fatores, entre os quais podem ser citados as observações macroscópicas e microscópicas, coleta, transporte, meios de cultura, identificação e suscetibilidade antimicrobiana.

Nas últimas décadas, as técnicas microbiológicas evoluíram extraordinariamente e com isso, uma variedade grande de metodologias têm sido utilizadas para testar a efetividade de agentes antimicrobianos em laboratório. Muitas vezes, resultados conflitantes têm sido encontrados em trabalhos que utilizaram as mesmas substâncias, os mesmos microrganismos e metodologias diferentes.

Os testes de sensibilidade antimicrobiana de substâncias odontológicas têm se mostrado útil tanto na orientação do tratamento clínico como nos estudos que investigam o efeito antimicrobiano de substâncias odontológicas utilizadas para controle microbiano. Na atualidade existem três métodos *in vitro* que podem ser utilizados para a determinação do espectro de atividade de agentes antimicrobianos.

O teste de difusão em Agar é realizado em placas de Petri contendo meio de cultura sólido, sobre o qual será semeado o microrganismo indicado para o teste. Os agentes antimicrobianos a serem testados são colocados em discos de papéis ou mesmo em poços feitos no meio de cultura. O raio formado da zona de inibição adjacente aos discos demonstra a difusão do agente antimicrobiano.

Contudo, o tamanho da zona de inibição estará diretamente relacionada à solubilidade e a difusibilidade da substância testada, podendo não demonstrar o seu total potencial (Siqueira *et al.*, 1998; Estrela, 2001).

O teste de diluição em caldo é utilizado para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) de um agente antimicrobiano (O'Hara *et al.*, 1993; D'Arcangelo *et al.*, 1999; Estrela, 2001).

A concentração inibitória mínima deve ser única para uma mesma substância, independentemente de sua concentração, levando em consideração o mesmo microrganismo, porém, pode variar de acordo com o microrganismo analisado. A CIM é efetivada com uma seqüência decrescente de concentrações do agente a ser testado em um meio de cultura líquido, o qual é inoculado com o microrganismo teste. Após o período de incubação, a turbidez é verificada e confirmada pela coloração do Gram e subcultivo em placas de Petri com meio de cultura específico para cada microrganismo. Este método apenas pode ser empregado em substância solúvel no meio de cultura (Estrela, 2001).

O método de contato direto tem sido utilizado no estudo do efeito antimicrobiano de substâncias utilizadas na Odontologia. Inicialmente microrganismos são cultivados em meios de cultura sólidos, incubados a 37° C em condições gasosas específicas. Células bacterianas são suspensas em meio de cultura caldo e sua concentração ajustada na escala de McFarland. A suspensão bacteriana é colocada em contato com a solução testada pelo período de tempo determinado. Decorrido o intervalo de tempo de estudo, alíquotas do material são retiradas e colocadas em tubos contendo meio de cultura líquido e incubados em

condições gasosas específicas para verificação do crescimento bacteriano. O método de contato direto está relacionado à efetividade da substância testada e ao seu contato direto com o microrganismo fornecendo, assim, informações qualitativas (Siqueira & Uzeda, 1998; Estrela, 2001).

Estudos recentes têm reavaliado a influência no modo de crescimento bacteriano e o efeito na resistência aos agentes testados, pois metodologias para determinar a concentração inibitória mínima, assim como a difusão em agar não refletem as condições de crescimento *in vivo*, onde as bactérias se desenvolvem na superfície dentária formando biofilme (Wilson, 1996).

Para identificar e caracterizar os elementos bacterianos e genéticos determinantes, que são necessários para o desenvolvimento do biofilme, várias metodologias têm sido aplicadas. Diversas pesquisas têm estudado a formação do biofilme através de métodos genéticos que utilizam corantes, como o cristal de violeta e a safranina. Este método determina as fases do desenvolvimento do biofilme, componentes presentes na estrutura bacteriana, como sistemas sensoriais necessários à adesão inicial, assim como as mudanças necessárias para a sua sobrevivência e maturação do biofilme (O'Toole *et al.*, 2000).

Técnicas moleculares, como o PCR, têm sido utilizadas no estudo das fases de formação do biofilme, pois esta técnica é capaz de ampliar fragmentos de DNA baseados no genoma de microrganismos conhecidos. Misturas de gens 16S rRNA ampliados de comunidades naturais têm revelado a presença de numerosos microrganismos que não são cultivados por métodos de cultura tradicionais. O resultado do sequenciamento genético pode ser usado para desenhar “DNA

PROBES” específicos a determinadas regiões de microrganismos incultiváveis, podendo ser utilizados para detecções clínicas (Pratten *et al.*, 2003).

Diferentes modelos de microscópios têm sido utilizados para determinar a formação e o desenvolvimento do biofilme. Entre os modelos utilizados todos apresentam problemas na interpretação das imagens produzidas.

Inúmeras estruturas do biofilme têm sido reveladas através do microscopia óptica. Grandes variedades de bactérias que não são cultivadas por métodos tradicionais, foram descritas através da utilização deste modelo de microscópio, demonstrando a diversidade de espécies que compõem o biofilme (Wimpenny *et al.*, 2000).

A **microscopia eletrônica de transmissão** (MET) tem sido amplamente usada no estudo das comunidades microbianas orais. A utilização desta técnica permite examinar estruturas celulares como: morfologia, disposição e ultra-estruturas. Com a utilização de alguns corantes, a estrutura da substância polimérica extracelular (SPE) pode ser determinada. Por exemplo, com o vermelho rutênio pode-se determinar os polissacarídeos, enquanto que o anticorpo "gold-labelled" identifica estruturas celulares específicas (Nyvad & Fejerskov, 1997; Wimpenny *et al.*, 2000).

O **microscópio eletrônico de varredura** (MEV) vem sendo utilizado no estudo da localização de microrganismos no sistema de canais radiculares, na superfície externa do ápice radicular e região periapical (Sen *et al.*, 1997; Gutiérrez *et al.*, 1999). É um importante instrumento para o diagnóstico no estudo

das patologias periapicais, permitindo avaliar a topografia e o limite das obturações endodônticas (Ferllini Filho, 1999; Rosa Neto, 1997).

Através do MEV é possível obter informações da estrutura da superfície do biofilme, como células e suas disposições. A presença de substância polimérica extracelular (SPE), poderá ser observada como uma fina camada. Caso o MEV seja equipado com acessórios baixo vácuo a espécie a ser analisada pode ser observada sem nenhum tratamento adicional (Wimpenny *et al.*, 2000).

CLSM (confocal laser scanning microscope) tornou-se uma das ferramentas mais poderosas nas pesquisas que envolvem o biofilme. O CLSM emite feixes de luz que se difundem através do biofilme, detectando sua estrutura formando uma imagem 2D. A geometria do sistema pode ser alterada de modo que o plano focal possa ter diferentes profundidades na espécie, até o mais profundo que a luz difusora possa penetrar. Utilizando técnicas de processamento de imagens, toda imagem 2D pode ser sobreposta e fotos em 3D podem ser produzidas da espécie analisada. Marcadores fluorescentes, como o resazurin, podem ser adicionados para detectarem e identificarem microrganismos, assim como podem ser usados para determinar aspectos bioquímicos, físico-químicos do meio ao seu redor e diferenciar microrganismos Gram-positivos dos Gram-negativos (Wimpenny *et al.*, 2000).

Cada vez mais microeletrodos são utilizados no estudo das estruturas existentes no interior do biofilme. Eles são utilizados por microbiologistas por mais de 20 anos, e podem determinar variáveis físico-químicas existentes no interior do

biofilme, tais como: a profundidade de penetração de oxigênio no interior das colônias, a mensuração de óxido nitroso, H₂S, Ph (Wimpenny *et al.*, 2000).

Os usos de microeletrodos associados à micro-fatias e outras técnicas físicas e químicas têm demonstrado que o biofilme é altamente estratificado. A espessura do biofilme é inversamente proporcional a sua atividade, ou seja, quanto mais profundo o biofilme menor a difusão de oxigênio (Chen & Bungay, 1981; de Bee *et al.*, 1993; Wimpenny *et al.*, 2000)

2.4. O que é Biofilme?

Comunidades microbianas associadas a uma superfície tem sido alvo de diversos estudos desde da criação dos primeiros microscópios oculares. Van Leeuwenhoek a mais de trezentos anos atrás observou o “animáculo” retirado da placa aderida à superfície de seu dente em seu microscópio primitivo (Rosan & Lamont, 2000). Black, em 1898, descreveu que esta placa gelatinosa aderida à superfície dentária resultava do acúmulo de diversas espécies bacterianas presentes no interior de um único nicho ecológico. Por volta de 1960, Johannes Van Houte e Ronald Gibbons reconheceram que estas bactérias aderidas a esta película poderiam ocasionar a formação de placa dental, cárie e doença periodontal (Portera, 1999). Entretanto, somente por volta de 1970, Costerton *et al.* (1987) descreveram que a forma sésil de existência bacteriana no biofilme constitui o maior componente da biomassa bacteriana em muitos meios, e

somente por volta de 1990, começou-se a observar que essas bactérias imóveis eram organizadas em meios elaborados (Costerton *et al.*, 1999).

Biofilme bacteriano pode ser definido como uma comunidade estruturada de micro-colônias de células bacterianas envolvidas em uma matriz extracelular de polissacarídeos, aderida a um substrato sólido úmido ou meio líquido da qual eles podem retirar seus nutrientes, constituindo uma forma de proteção ao desenvolvimento bacteriano em meios hostis (Figura. 1) (Costerton *et al.*, 1987; De beer *et al.*, 1993; Costerton *et al.*, 1999; Portera, 1999; Wimpenny, 2000).

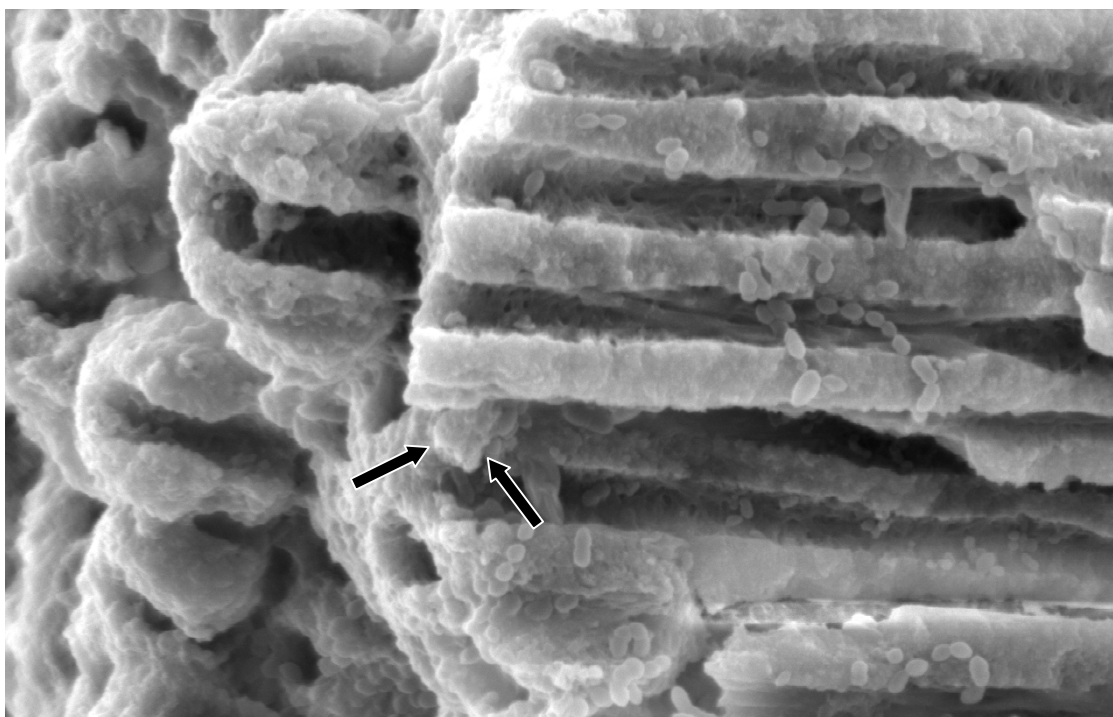


Figura 1. Formação de biofilme na parede dentinária.

Biofilme pode ser formado por uma ou por múltiplas espécies. No biofilme de espécie única, cada célula bacteriana ocupa individualmente um único nicho espacial no interior de micro-colônias de células de uma mesma espécie (Lawrence *et al.*, 1992). As atividades metabólicas destas células são controladas por expressões fenotípicas de gens específicos que são responsáveis pela adesão à superfície, pelas condições da superfície, ou pelo modo de crescimento (Davies *et al.*, 1993).

A matriz do biofilme é tipicamente composta de polissacarídeos que podem conter um ou mais ácidos aniônico urônicos, é densamente concentrada ao redor das micro-colônias que a produzem e menos densa nos espaços intercoloniais, que se apresentam mal-definidos, com distribuição dispersa. Nestes espaços, existe um sistema circulatório formado por canais que permitem escoamento e rápido equilíbrio iônico e molecular dentro da massa fluida (Costerton *et al.*, 1994). Em essência, o biofilme formado por uma única espécie apresenta algumas vantagens sobre a vida multicelular, onde o seu sistema circulatório primitivo entrega os nutrientes da massa fluida para o nicho micro-colonial e remove os subprodutos metabólicos pelo o mesmo processo. Agentes inibitórios e antibacterianos são separados das células internas das micro-colônias por uma barreira de difusão polimérica aniônica (Costerton *et al.*, 1994; Kimberly, 2004).

Em biofilme formado por várias espécies, micro-colônias de espécies diferentes são formadas pela proporção da população sésil a partir do momento em que células de espécies metabolicamente cooperantes são justapostas e estão

numa posição que beneficia trocas de substratos entre as espécies e/ou remoções mútuas de detritos residuais (MacLeod *et al.*, 1990; Kimberly, 2004).

Bactérias anaeróbicas e aeróbicas podem crescer lado a lado, utilizando o mesmo sistema circulatório. O modo de crescimento fixo existente no biofilme faz esta cooperação metabólica possível, e células individuais vivem em um único micro-nicho no interior de biofilme formado por múltiplas espécies e inteiramente desenvolvido, onde nutrientes são fornecidos por difusão e pelas células vizinhas, e os resíduos são removidos pelo o mesmo processo. Os antagonistas são mantidos a distância pelas barreiras de difusão (Costerton *et al.*, 1987).

Embora o biofilme formado por várias espécies bacterianas seja predominante em muitos meios, os de espécie única são responsáveis por um grande número de infecções, como nas endocardites bacterianas (O'Toole *et al.*, 2000; Kimberly, 2004).

Estudos indicam que o biofilme é o ponto estável no ciclo biológico que engloba a iniciação, a maturação, a manutenção, e dissolução (Fig. 2) (O'Toole *et al.*, 2000; Stoodley *et al.*, 2002). A formação do biofilme pode ocorrer por três mecanismos (Stoodley *et al.*, 2002). O primeiro é pela redistribuição de células fixas através da motilidade de sua superfície (Korber *et al.*, 1995). O segundo mecanismo ocorre por divisão binária das células fixas à superfície. Após a divisão, células filhas se expandem externamente e para cima, se ligando a superfície e formando aglomerados de células, de forma similar à formação de colônias em placas de Agar (Heydorn *et al.*, 2000). O terceiro mecanismo de

agregação ocorre pelo recrutamento de células presentes no meio externo para o desenvolvimento do biofilme (Tolker *et al.*, 2000).

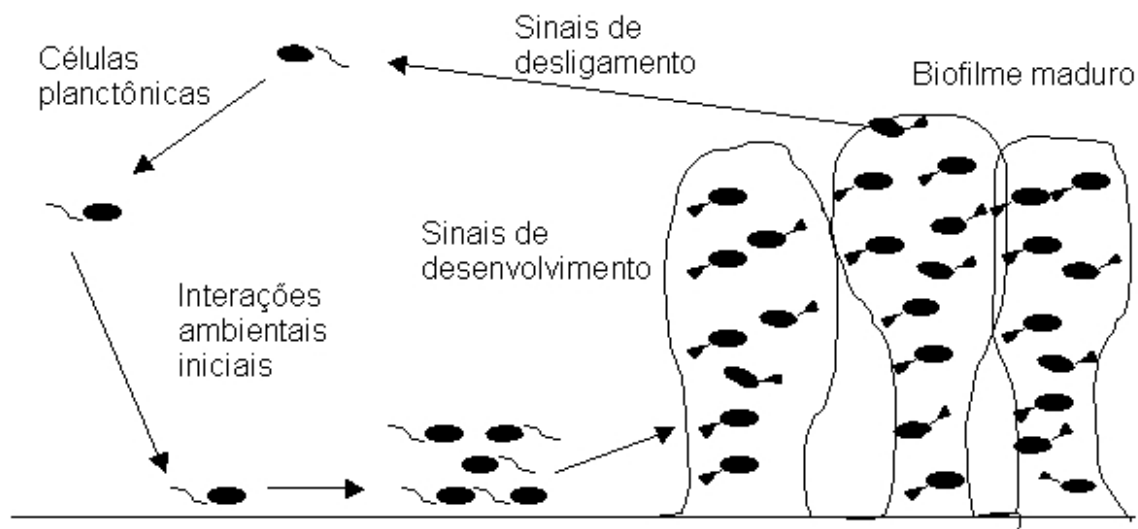


Figura 2. Modelo de desenvolvimento do biofilme segundo (Stoodley *et al.*, 2002)

A formação do biofilme tem início quando os microrganismos recebem estímulos que podem causar a transição da vida livre (planctônica) para uma vida aderida a uma superfície (Carlsson, 1997; Pratt & Kolter, 1998; Stoodley *et al.*, 1999). Estes sinais variam de acordo com cada microrganismo. Alguns microrganismos requerem exigências nutricionais, tais como *Escherichia coli* K-12 que necessita de um meio com a presença de amino ácido (Pratt & Kolter, 1998). Em contraste, *Escherichia coli* 0517: H7 somente forma biofilme em condições de baixa concentração de nutrientes (Dewanti & Wong, 1995). A atividade da

Escherichia coli no centro do biofilme diminui com o crescimento da justaposição de novos microrganismos, podendo ter suas atividades restauradas com a adição de carbono nascente, indicando que a atividade celular no interior do biofilme pode ser controlada pela viabilidade nutricional (Stoodley *et al.*, 2002). Em adição a disponibilidade de nutrientes (abundância ou escassez) no meio, outras condições ambientais podem influenciar a formação do biofilme, como temperatura, pH, osmolaridade, transições aeróbica-anaeróbica, ferro e oxigênio (Carlsson, 1997; Pratt & Kolter, 1998; Stoodley *et al.*, 1999; Kimberly, 2004).

Os primeiros microrganismos a se fixarem são denominados de colonizadores primários, sendo esta colonização inicial mediada através de interações físico-químicas, específica ou não específica, com os componentes do substrato (Marsh & Bradshaw, 1995; Rickard *et al.*, 2003) (fig. 3a).

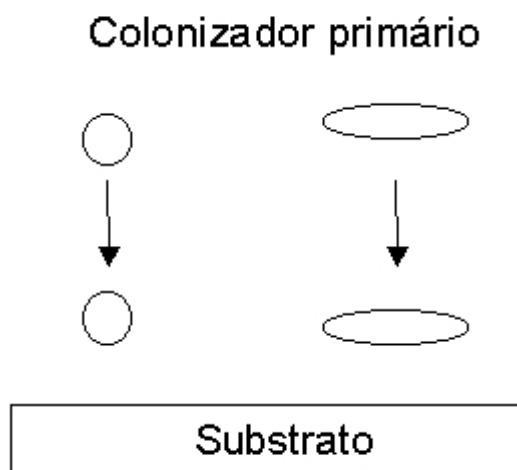


Figura 3a. Formação do biofilme: colonização primária (Rickard *et al.*, 2003).

Para que esta interação inicial se torne um vínculo permanente é necessário que ocorra a presença de polímeros extracelulares, como a “IV polar pili” que é responsável pelo modo de locomoção usada por microrganismos sobre o substrato para a formação de micro-colônias a partir da colonização primária (Fig.3b) (Kolenbrander & Anderson, 1990; Ganeshkumar *et al.*, 1991; O’Toole *et al.*, 2000; Rickard *et al.*, 2003).

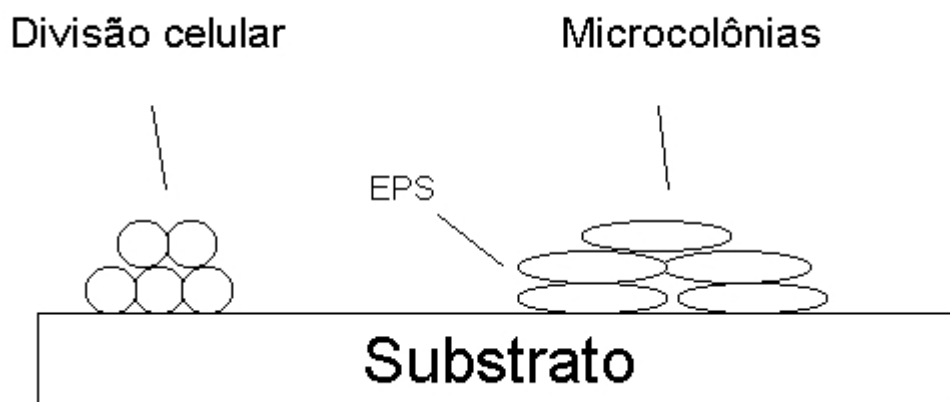


Figura 3b. Formação do biofilme: crescimento celular, divisão e produção de polissacarídeo extracelular (EPS) (Rickard *et al.*, 2003).

Streptococcus são os principais colonizadores primários na formação do biofilme. Eles se unem às proteínas ácidas, ricas em prolina e em outros receptores existentes na película adquirida, como alfa-amilase e ácido siacílico (O’Toole *et al.*, 2000). Os *Streptococcus* tanto participam da coagregação intragenerica, ou seja, coagregação entre microrganismos da mesma espécie,

permitindo que novos *Streptococcus* se unam em uma única camada, assim como coagregação entre outro grupo de colonizador primário, como o *Actinomyces* (Kolenbrander & Anderson, 1986; Kolenbrander, 1988; Kolenbrander *et al.*, 1990).

Um número de lipoproteínas, incluindo FimA [adesina associado a pili (Oligino & Fives-Taylor, 1993)], ScaA [parte do transportador ABC que especificamente participa da interação entre estreptococcus com actinomicetes (Kolenbrander & Anderson, 1990)], ScbA (Correia *et al.*, 1995), PsaA (Sampson *et al.*, 1994), e SsaB [a qual é similar ao adesina fimbrial (Ganeshkumar *et al.*, 1991)], são necessários para a coagregação. A proteína adesina 203-kDa Hs é uma proteína lecitina-like associada a estruturas fibrilares e media a associação com componentes salivares, leucócitos polimorfonucleares e a coagregação com outras espécies de bactérias (Rickard *et al.*, 2003). A adesina SspA e SspB mediam a coagregação do *Streptococcus* com *Actinomyces* e *Prevotella*. Além de mediar a coagregação eles também mediam a adesão a glicoproteínas, fibronectinas e colágenos (Love *et al.*, 2000).

A coagregação intragenérica entre *Streptococcus* pode ser bloqueada pela presença de açúcares, incluindo lactose e galactose presentes na proteína adesina 100-kDa (Kolenbrander *et al.*, 1989; Kolenbrander *et al.*, 1990).

Cada grupo de *Streptococcus* e *Actinomyces* se ligam a moléculas salivares específicas. Conseqüentemente, de uma combinação comum com moléculas salivares, cada cepa de colonizador primário será coberta por moléculas distintas. Células idênticas podem se aglutinar e se unirem à micro-concentrações e justaposições de cepas em particular. Alternativamente, grupos

agregados podem crescer se unindo a micro-colônias cobertas por específicas moléculas salivares. Tais eventos podem alterar a diversidade das moléculas salivares expostas aos colonizadores secundários. Neste caso, colonizadores primários ditam pequenos ajustes no tempo de acréscimo dos colonizadores secundários (Whittaker *et al.*, 1996 a e b).

Streptococcus e *Actinomyces*, que são microrganismos anaeróbios facultativos, crescem rapidamente, duplicando sua população durante as primeiras quatro horas de formação do biofilme, e mais lentamente nas horas seguintes. Estes grupos de microrganismos preparam o ambiente para os colonizadores secundários que possuem maiores exigências quanto ao requerimento gasoso e crescem mais lentamente.

Quando ocorrem mudanças nas condições ambientais no interior do biofilme em formação e o substrato existente esteja coberto por bactérias responsáveis pela colonização primária (Fig. 2c), colonizadores secundários tornam-se capazes de se unirem aos primários, e a partir deste momento o biofilme começa a se desenvolver dentro de uma comunidade com múltiplas espécies (Fig. 2d), onde microrganismos que antes não poderiam sobreviver em ambientes originalmente aeróbios, agora são capazes de gerar biofilme anaeróbio (Rickard *et al.*, 2003).

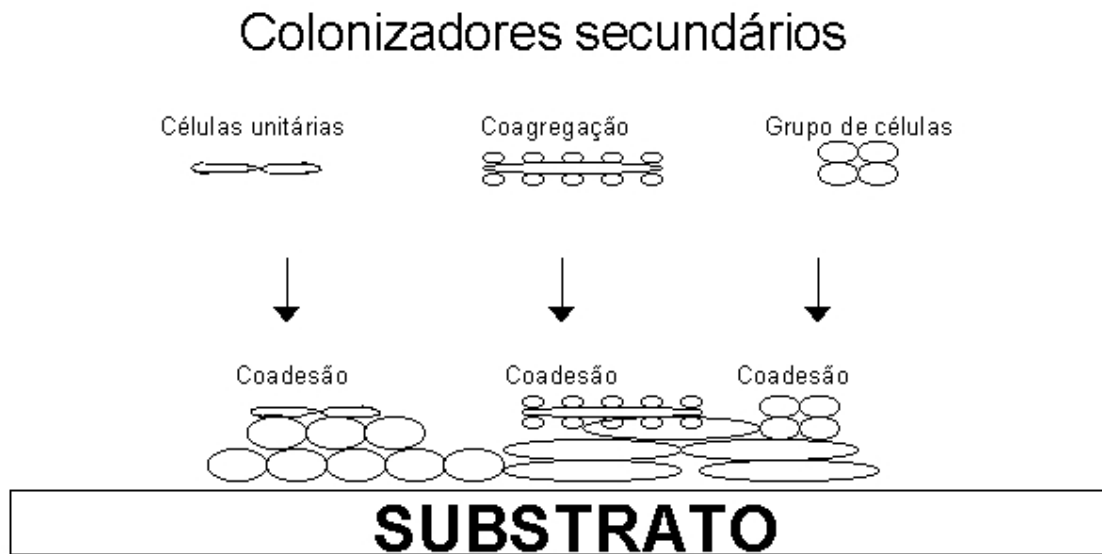


Figura 3c. Coadesão de células individuais, coagregadas e grupo de células (Rickard *et al.*, 2003).

Coagregação é o processo em que as bactérias geneticamente distintas se unem umas as outras através de moléculas específicas (Rickard *et al.*, 2003). Este mecanismo contribui para o desenvolvimento do biofilme através de dois caminhos (fig.2c): O primeiro caminho ocorre quando células individuais em suspensão reconhecem e aderem a células geneticamente distintas para o desenvolvimento do biofilme; o segundo caminho é quando ocorre primeiramente uma coagregação entre os colonizadores secundários em suspensão seguidos da adesão dos mesmos para o desenvolvimento do biofilme. Em ambos os casos, células bacterianas em suspensão (células planctônicas) aderem a células do biofilme num processo conhecido com coadesão (Busscher *et al.*, 1995). Somente após a

coadesão, as células bacterianas podem ser consideradas parte integrante da comunidade existente no biofilme (Rickard *et al.*, 2003).

Durante o período de desenvolvimento do biofilme ocorre um importante evento fisiológico responsável pela adesão dos colonizadores secundários à estrutura do biofilme, que é o aumento da produção de substância polimérica extracelular (SPE). Esta substância envolve as células fixas no interior do biofilme, fortalece a adesão entre as células, promove o suporte estrutural do biofilme e pode agir como receptor para novas interações. O SPE é composto de polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Stoodley *et al.*, 2002). Deste modo, como consequência da coagregação, coadesão e divisão celular, assim como a adesividade natural do SPE, aglomerações de células geneticamente idênticas são geradas dentro de biofilmes multi-espécies, chamado de mosaico clonal (Rickard *et al.*, 2002) (fig 2d). Associadas ao aumento da produção de SPE, bactérias presentes no biofilme desenvolvem outras propriedades, tais como resistência a antibióticos, alterações genéticas, capacidade biodegradativa alterada, aumento da produção de metabólitos secundários e aumento da resistência à luz UV (O'Toole *et al.*, 2000).

Biofilme multi-espécie maduro

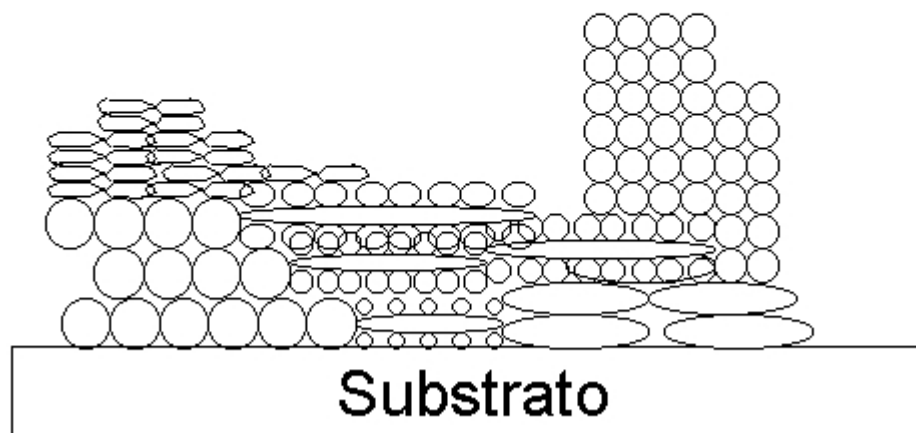


Figura 3d. Maturação do biofilme e formação de mosaico clonal (Rickard *et al.*, 2003).

Fusobacterium nucleatum desempenham importante papel na formação e maturação do biofilme, coexistindo em meios aeróbios através de interações físicas (coagregação) entre microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos. Esta espécie age como elo de união entre os colonizadores primários (como *Streptococcus*) e bactérias (especialmente anaeróbios estritos) mais usualmente associadas com o biofilme maduro. Evidências da importância do *F. nucleatum* na complexa estrutura do biofilme são as seguintes: colonizadores primários coagregam entre si e com *F. nucleatum*; entretanto, colonizadores secundários para fazerem parte da estrutura do biofilme necessitam coagregar diretamente com o *F. nucleatum*, pois estes microrganismos não coagregam com os colonizadores primários e dificilmente coagregam entre eles (Kolenbrander, 2000).

F. nucleatum podem se ligar diretamente ao substrato através de um componente presente na estrutura do meio chamada “Statherin”, assim como pode se ligar a hidroxiapatita através da proteína rica em prolina (PRP). Além de poderem se ligar diretamente ao substrato, *F. nucleatum* se ligam a todos os microrganismos presentes na cavidade oral, tornando-o essencial na formação e estruturação do biofilme (Gillece-Castro *et al.*, 1991; Whittaker *et al.*, 1996 a e b).

Importantes comunicações metabólicas ocorrem entre *F. nucleatum* e outros colonizadores secundários através das coagregações: *F. nucleatum* é uma espécie não-proteolítica ou levemente proteolítica, mas produzem plasminogênio, o qual pode ser convertido em plasmina, que é proteoliticamente ativa. Esta ativação tanto pode ocorrer pela incubação de *Fusobacterium* com estreptoquinase, ou com cultura supernadante de *Porphyromonas gingivalis*. *P. gingivalis* é altamente proteolítica e coagrega fortemente com o *F. nucleatum*. Subseqüentemente a coadesão confere ao *Fusobacterium* a habilidade de destruir as células de defesa e invadirem tecidos, contribuindo para destruição tecidual. Estudos indicam que estas duas espécies bacterianas quando coagregadas causam lesões maiores do que quando não estão associadas (Feuline *et al.*, 1996; Kolenbrander, 2000).

A coagregação de *F. nucleatum* com muitos microrganismos gram-negativos é mediado através da galactoside, um componente da superfície do *Fusobacterium* (Whittaker *et al.*, 1996 a e b).

Porphyromonas, tanto *P. gingivalis* como *P. endodontalis*, possuem grande capacidade de se ligarem a várias superfícies orais, outras bactérias,

componentes salivares, complexo fibronectina-colágeno, eritrócitos e monócitos e células epiteliais. Fibrinogênio e histaminas inibem a coagregação entre *Porphyromonas* e *Streptococcus* (Whittaker *et al.*, 1996 a e b).

Coagregação entre *P. gingivalis* e *S. gordonii* é inibida pela proteína salivar 43-KDa, mas esta proteína é rapidamente degradada por proteases. Tanto *Porphyromonas* como *Streptococcus* produzem proteases que eliminam inibidores. Em contraste, proteases da superfície de *P. gingivalis* mediam a coagregação com *A. viscosus*. Fimbrias presentes em *P. gingivalis* desempenham um importante papel na coagregação de *Porphyromonas* com vários microrganismos como *S. gordonii* e *A. naeslundii*, assim como na união a hidroxiapatita (Stinson *et al.*, 1992; Whittaker *et al.*, 1996 a e b).

P. gingivalis produz vesículas extracelulares que se ligam ao soro, saliva e hidroxiapatita, mediam a união entre *Streptococcus* e hidroxiapatita, e agem como ponte de ligação entre não-coagregados *Eubacterium saburreum* e *Capnocytophaga ochracea*. *P. gingivalis* usam estas vesículas, que podem se unir a fibronectina, fibrinogênio e colágeno para obter vantagens na colonização da superfície oral (Cimasoni *et al.*, 1987; Whittaker *et al.*, 1996 a e b).

Pouco se sabe sobre o mecanismo utilizado por *Prevotella intermedia* para participar da coagregação intragenérica com outros microrganismos que habitam a cavidade oral. *Prevotella intermedia* é considerada uma das espécies de colonizadores primários nos tecidos gengivais. Sua coagregação com vários microrganismos está relacionada com proteínas e glicoproteínas existentes em

sua superfície, que são reconhecidos pelos receptores de carboidratos presentes nos microrganismos associados (Nesbitt *et al.*, 1993).

P. intermedia apresentam-se como guia para a migração de *P. gingivalis*, presentes nas regiões supragengivais para as regiões sub-gengivais, ao coagregar com a mesma. Esses microrganismos apresentam uma estreita relação de mutualismo e comensalismo. Primeiramente, *P. intermedia* apresentam em sua superfície celular receptores Fc que reduzem a quantidade de IgG, que pode atacar o *P. gingivalis*. Em segundo lugar, a atividade hemolítica de *P. intermedia* é maior do que aquela realizada por *P. gingivalis*. *P. intermedia* favorece o crescimento do *P. gingivalis* ao liberarem hemoglobinas livres, que é um fator essencial ao seu desenvolvimento (Kamaguchi *et al.*, 2001).

Coagregação entre *P. intermedia* e *S. salivarius* é mediado, por fimbrias existentes na superfície celular de *S. salivarius* e de receptores proteináceos existentes na superfície celular de *P. intermedia* (Lamothe *et al.*, 2003).

Com respeito à formação do biofilme estafilococal, a primeira ênfase é dada às fases de fixação e acumulação, a qual são mediadas por vários tipos de adesinas. Mais especificamente, um grupo de proteínas expostas na superfície, chamados coletivamente de MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) aparecem como os fatores determinantes primários na fixação inicial ao substrato, enquanto que a fase de acumulação está na dependência das adesinas polissacarídicas que promovem as interações adesivas entre as células bacterianas. Apesar de existirem inúmeras adesinas relacionadas a fase de acúmulo bacteriano, a adesina determinante primária é a

adesina polissacarídica intercelular (API), cuja produção é dependente de gens presentes no *ica*ADBC operon. Estudos na composição do API demonstram que ele consiste do polímero *N*-acetilglucosamina, e por isto tem sido chamada de PNAG (O'Toole *et al.*, 2000).

A expressão do *ica* operon no *Staphylococcus aureus* são sujeitos a regulamentações ambientais e são controlados parcialmente pelo estresse em resposta a transcrição do fator " δ^B ". Em adição, o crescimento anaeróbio induz a expressão do *ica* operon e a produção do PIA no *S. aureus* (O'Toole *et al* 2000).

A regulação da expressão do *ica* e a habilidade de formar o biofilme envolvem outros elementos regulatórios além do fator δ^B , tais como o gen regulador acessório (*agr*) e regulador acessório estafilococal (*sarA*). O locus *agr* codifica a dois componentes do sistema "quorum-sensing" que modula a produção da molécula reguladora RNA (RNAIII). Indução da síntese do RNAIII resulta na redução da produção das proteínas de superfície (MSCRAMMs) e o concomitante aumento na produção de exotoxinas, que estão negativamente relacionados com a redução na capacidade de formação do biofilme (O'Toole *et al*, 2000).

A persistência no interior do biofilme, a produção de SPE e em que fase este é formado pelo *S. aureus* ainda não é identificada. Existem evidências que δ^B desempenha papel na sua formação (Baselg *et a.l*, 1993; O'Toole *et al.*, 2000) .

Leveduras, como *Candida albicans*, têm a capacidade de formar biofilme tanto em superfície bióticas como abióticas. Na cavidade oral, possuem a habilidade de colonizar a língua, palato, mucosa bucal, placa sub-gengival e em dente. A mudança entre a forma de fungos para hifa desempenha um papel

importante no desenvolvimento do biofilme. Observações realizadas através de microscopia demonstram que nas primeiras camadas do biofilme são formadas pela forma de fungo e em seguida, camadas de células filamentosas na forma de hifa, envolvida por uma extensiva camada de matriz de exopolissacarídeo (Lamfon *et al.*, 2003; El-Azizi *et al.*, 2004; Järvensivu *et al.*, 2004).

Cepas incapazes de formar hifas formam biofilmes finos de células fúngicas, podendo ser removidos mais facilmente da superfície, demonstrando que a forma de fungo é o colonizador primário na formação do biofilme, e que a forma de hifa é importante na maturação do mesmo. A proporção entre a forma fungica e a de hifa está relacionada à disponibilidade de nutrientes. Biofilme que se desenvolve em meio rico em nitrogênio possui o predomínio da forma fúngica. Entretanto, aqueles que se desenvolvem em meio semelhante à saliva humana possuem um predomínio da forma de hifa (Lamfon *et al.*, 2003; Siqueira & Sen, 2004).

A adesão a várias superfícies por *C. albicans* é mediada por molécula presentes na superfície. Entre estas moléculas incluem-se receptores homólogos para a integridade humana CR3, ao qual se liga RGD (ácido arginine-glycine-aspartic) a grupos de iC3b, fibrinogênio, fibronectina, laminina, e vitronectina. A Lecitina se liga aos açúcares das células epiteliais. *Candida spp* também podem se ligar ao colágeno tipo I e IV (Siqueira & Sen, 2004).

Durante a maturação do biofilme, fungos desenvolvem novas propriedades fisiológicas diferentes dos seus similares planctônicos, tornando *C. albicans* resistentes à vários componentes antifúngicos que são rotineiramente utilizados

no ambiente clínico. Esse fenótipo de resistência a drogas é normalmente associado a biofilmes bacterianos, demonstrando claramente que este aumento de resistência antibiótica não é devido simplesmente ao decréscimo da taxa de crescimento observada em fungos nas superfícies e sim a associação com bactérias constituintes de biofilme, assumindo uma estratégia comum de resistência (Siqueira & Sen, 2004).

A adesão de *C. albicans* é significativamente reduzida quando ela é adicionada em um biofilme pré-formado de *C. krusei*, *C. lipolytica* e *C. guillieromondii*. Este efeito não é observado quando é adicionado em um biofilme pré-formado com outras espécies de *Candida*. Entretanto, quando *Candida* spp. é adicionada ao biofilme pré-formado de *C. albicans*, ocorre um aumento significativo na adesão da *C. parapsilosis*, e um decréscimo na adesão com *C. guillieromondii*. Quando *C. albicans* são adicionados a biofilme pré-formado de bactérias, o número de células fúngicas no interior do biofilme diminui significativamente, exceto quando isoladas pela produção de glicocálice. Além disso, a adição de bactérias ao biofilme pré-formado de *C. albicans* mostra diferentes tipos de interações. O número de células de *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia marcescens* aumentam no interior do biofilme. Este efeito não é observado com *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella pneumoniae*, cujo número de células diminui significativamente no interior do biofilme. A adição de *C. albicans* com outros microrganismos simultaneamente resulta em uma significativa redução na adesão

da *C. albicans*, exceto com *P. aeruginosa* (El-Azizi *et al.*, 2004; Siqueira & Sen, 2004).

E. faecalis são importantes patógenos em muitas infecções, entretanto pouco se sabe sobre o mecanismo de formação do biofilme e dos mecanismos de virulência utilizados por esta espécie, apesar de que alguns supostos fatores de virulência já foram descritos. Paralelo às proteínas de superfície e os polissacarídeos que estão relacionados com sua virulência, a habilidade de *E. faecalis* de sobreviver no interior de leucócitos polimorfonucleares (PMN) e macrófagos tem sido examinada. Substâncias de agregação (SA) têm sido indicadas como responsável pela internalização do *E. faecalis* para o interior do PMN, aumentando assim sua resistência (O'Toole *et al.*, 2000; Distel *et al.*, 2002; Baldassarri *et al.*, 2004).

A formação do biofilme por *E. faecalis* é influenciada tanto pela presença adicional de carboidratos quanto pela depleção de ferro no meio. Toledo-Arana *et al.*, em 2001 mostraram que a proteína codificada no gene da superfície enterococal (Esp) é relacionada como a agregação primária de *Enterococcus* em superfícies abióticas, contudo, a adesina que se encontra presente na superfície do *E. faecalis* também estar relacionadas com a agregação, principalmente em cepas com grande capacidade de formar biofilme (Hufnagel *et al.*, 2004).

Toledo-Arana *et al.*, (2001) mostraram que Esp é um dos mediadores na agregação inicial do *E. faecalis*. Na segunda fase de produção do biofilme, moléculas como adesinas, mediam a agregação secundária dos microrganismos a

superfície, como a outros microrganismos, iniciando a formação das micro-colônias. Na maturação do biofilme, os microrganismos mudam seu metabolismo, dão início a produção de exopolissacarídeos para a formação de glicocálice, e separam-se em micro-colônias no interior do biofilme (Hufnagel *et al.*, 2004).

3. PROPOSIÇÃO

Este trabalho teve como propósito:

1. avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de substâncias químicas auxiliares utilizadas duranteo preparo químico-mecânico frente a biofilmes de espécie única de microrganismos aeróbios, anaeróbios facultativos e anaeróbios estritos comumente encontrados na microbiota endodôntica. As substâncias químicas auxiliares testadas foram: NaOCl 5,25%, NaOCl 2,5% e clorexidina gel e líquida 2,0%, com ou sem agitação mecânica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. *Microrganismos*

4.1.1.1. Aeróbios:

- *Candida albicans* (NTCC 3736)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)

4.1.1.2. Anaeróbio facultativo:

- *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)

4.1.1.3. Anaeróbios estritos (isolados clinicamente dos canais radiculares):

- *Prevotella intermedia*
- *Porphyromonas gingivalis*
- *Porphyromonas endodontalis*
- *Fusobacterium nucleatum*

4.1.2. *Meios de cultura utilizados*

- Brain Heart Infusion Broth (BHI)- Oxoid, Unipath Ltd, Basingstoke, UK
- Brain Heart Infusion Agar (BHIA)- Oxoid, Unipath Ltd, Basingstoke, UK

- Fastidious Anaerobe Broth (FAB)- Lab M, Bury,UK
- Fastidious Anaerobe Agar (FABA)- Lab M, Bury,UK

4.1.3. ***Substâncias Químicas Auxiliares testadas:***

- Clorexidina gel 2% (CLX gel)
- Clorexidina líquida 2% (CLX líquida)
- Hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl)
- Hipoclorito de sódio 5,25%
- Salina tamponada - grupo controle

Todos os irrigantes utilizados foram manipulados na mesma farmácia de manipulação (Proderma Farmácia de Manipulação Ltda. -Piracicaba, SP).

4.2. ***Métodos***

A metodologia utilizada neste trabalho foi adaptada da empregada por Spratt *et al* (2001).

4.2.1. ***Preparo do inóculo***

Para a padronização do inóculo utilizou-se da metodologia empregada por Koo *et al*. 1999, Gomes *et al*, 2001 e Vianna 2002.

Culturas puras de *E. faecalis* (ATCC 29.212), *S. aureus* (ATCC 25.923), *C. albicans* (NTCC 3736) em caldo de Brain Heart Infusion Broth (BHI) foram

subcultivados em placas de Brain Heart Infusion Agar (BHIA) + 5% de sangue de carneiro desfibrinado (EBEFARMA, Araras, SP) e incubadas por 24/48 horas a 37°C em atmosfera de O₂ para os aeróbios e 10% de CO₂ para os facultativos. Culturas puras de *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P.intermedia* e *F. nucleatum* (retirados do estoque congelado de coletas clínicas) em caldo de Fastidious Anaerobe Broth (FAB) foram subcultivadas em placas de Fastidious Anaerobe Agar (FABA)+ 5% de sangue de carneiro desfibrinado (EBEFARMA, Araras, SP) e incubadas a 37°C em câmara de anaerobiose (Don Whitley Scientific, Bradford, UK) em atmosfera de 80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂ por 48 horas.

Após crescimento em meio sólido, colônias isoladas de cada bactéria foram suspensas em tubos contendo 5 mL de BHI para aeróbios e anaeróbios facultativos e FAB para anaeróbios estritos. Após agitação mecânica em vórtex, a suspensão era ajustada no espectrofotômetro com absorbância de 800 nm, até atingir a concentração equivalente a 0.5 para aeróbios e anaeróbia facultativos (transmitância 90) da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC) e 1,0 para anaeróbios estritos (transmitância 80) da escala de McFarland ($3,0 \times 10^8$ UFC).

4.2.2. Formação do biofilme

Biofilmes de espécie única foram formados sobre filtros de membranas de nitrato de celulose (0,2µm porosidade, 13 mm de diâmetro – Whatman International Ltd, Maidstone, UK). As membranas foram posicionadas individualmente sobre placas de BHIA + 5% de sangue de carneiro desfibrinado para formar os biofilmes dos microrganismos aeróbios e facultativo e o meio FAA + 5% de sangue de carneiro

desfibrinado pré-reduzido foi utilizado para gerar os biofilmes dos microrganismos anaeróbios estritos. Em seguida, 20 µm da suspensão bacteriana foi inoculado e plaqueados, as placas foram incubadas por 10 dias em condições gasosas específicas para cada microrganismo (O₂ para os microrganismos aeróbios, CO₂ para o facultativo e em 80% N₂, 10% H₂ e 10% CO₂ para os anaeróbios estritos).

Após o período de incubação, as membranas contendo os biofilmes foram retiradas assepticamente das placas de agar e transferidas cuidadosamente, para que não houvesse destruição da estrutura do biofilme, para dentro de tubos contendo 5 mL da substância química a ser testada ou para o controle. A substância química auxiliar e as membranas contendo os biofilmes foram deixados em contato por 30 segundos, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos e 60 minutos a 22°C. Um grupo sofreu agitação mecânica (vortex) por 15 segundos e outro não. Decorrido os tempos testados, os filtros de membrana foram transferidos 2mL de meio de cultura em caldo contendo substâncias neutralizadoras da ação antimicrobiana das substâncias químicas (Tween 80 a 0,5% + lecitina de soja a 0,07% para a clorexidina e thiosulfato de sódio a 6% para NaOCl), a fim de se evitar a ação residual (Gomes *et al.* 2001). Em seguida, os meios contendo as membranas sofreram agitação por 1 minuto para criação da suspensão bacteriana. Diluições em série de 10⁻¹ a 10⁻¹⁰ foram realizadas em frascos contendo meio líquido reduzido e alíquotas de 25µL foram plaqueada em BHI Agar contendo 5% de sangue de carneiro desfibrinado (para microrganismos aeróbios e facultativo) ou FAA contendo 5% de sangue de carneiro desfibrinado (para microrganismos anaeróbios estritos). As placas foram incubadas a 37°C em

para permitir o crescimento microbiano por 24 horas para aeróbios em estufa de O₂, 48 horas para facultativo em estufa de CO₂ e 7 dias para anaeróbios estritos em cabine de anaerobiose. O número de unidade colônias formadas (CFU) foi calculado utilizando-se das diluições (10⁻¹ a 10⁻¹⁰). Três réplicas foram feitas para cada agente antimicrobiano.

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através do teste de Fridman e do teste de análise de sobrevivência. Estes testes foram aplicados utilizando-se a metodologia indicada em Pontes (2000) e Pontes & Corrente (2001).

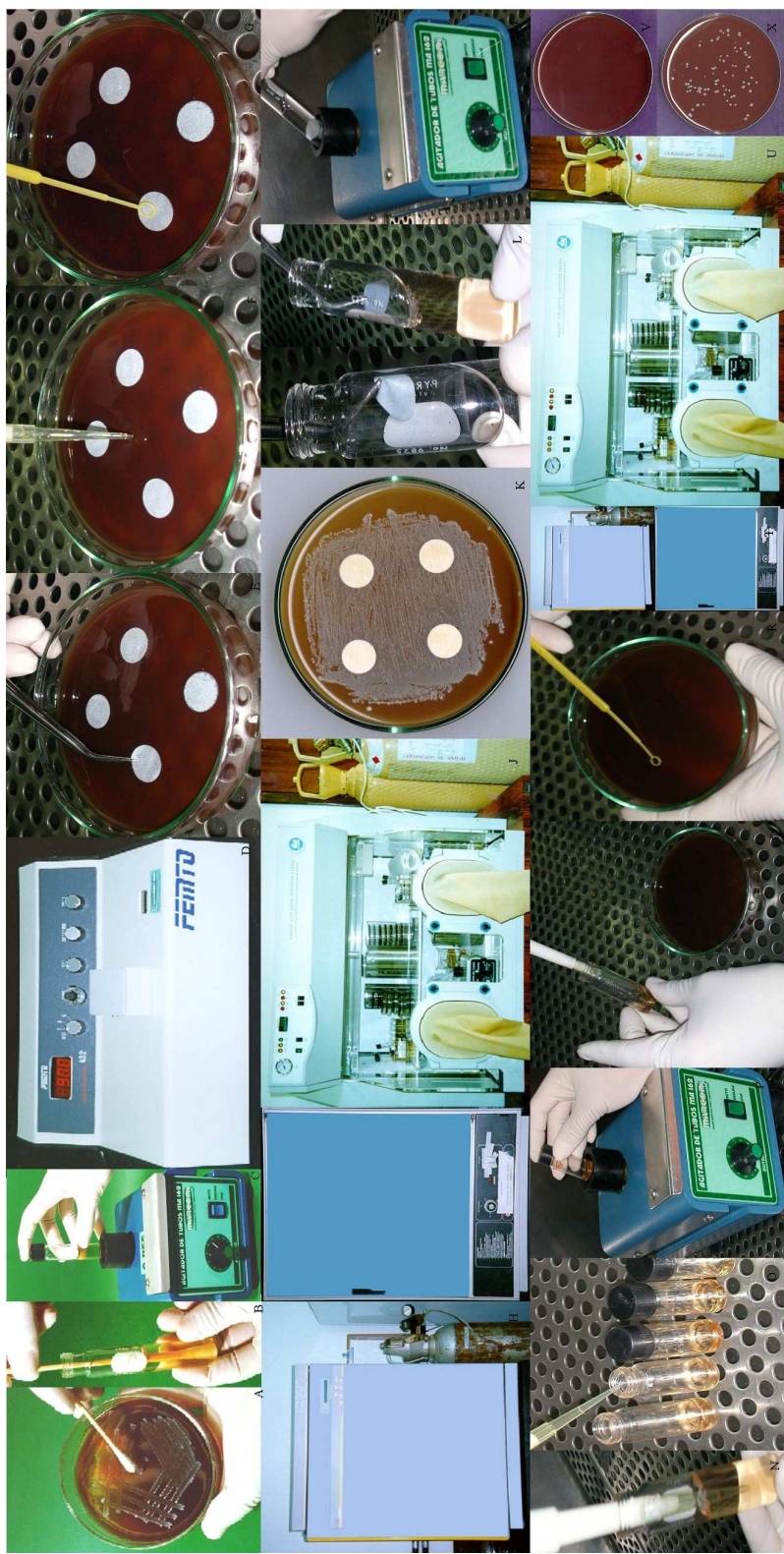


Fig.4: A: Cultura pura de microrganismo; B, C,D: Preparo, Agitação (1 min), Padronização da suspensão microbiana; E: Posicionamento das membranas sobre ágar sangue; F: Pipetagem do inóculo; G: Plaqueamento sobre as membranas; H,I,J: Colônias puras dos microrganismos testados, incubação pelo período de 10 dias (em condições gasosas adequadas); K: Formação de biofilme sobre a membrana de nitrato de celulose; L: Colocação da membrana em contato com agente antimicrobiano por 30s e 5, 10, 15, 30, 60 minutos (com e sem agitação mecânica); M: Transferência das membranas para 3ml de meio de cultura (BHI para aeróbios e facultativos; FAB para anaeróbios estritos) com soluções neutralizadoras (tiosulfato 0,062 para NaOCL; 0,5% tween 80 + 0,07% lecitina para a clorexidina); N: Agitação para formação suspensão bacteriana; O: Remoção de 100µl da suspensão bacteriana; P,Q: Diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-10}); R: Plaqueamento de 50 µl das diluições (BHI ágar para facultativos e FAA para anaeróbios estritos) acrescidos de 5% de sangue de carneiro desfibrinado; S,T,U: Incubação em condições gasosas apropriadas pelo período de 24 e 48 horas; V,X: Verificação do crescimento microbiano.

5. RESULTADOS

5.1. Atividades antimicrobianas das substâncias químicas auxiliares testadas frente a biofilme de espécie única (Tabelas 1 e 2).

Hipoclorito de sódio 2,5% e 5,25% e Clorexidina gel e líquida 2% foram agentes efetivos contra todos os biofilmes testados. Salina tamponada não teve ação antimicrobiana, permitindo o crescimento em todos os tempos testados.

Hipoclorito de sódio 5,25% foi a substância química auxiliar que desestruturou todos os biofilmes testados em menores tempos, eliminando 100% dos microrganismos, tanto sob agitação como sem agitação.

Hipoclorito de sódio 2,25% sob agitação necessitou de 5 minutos para eliminar todos os microrganismos formadores do biofilme, entretanto sem agitação mecânica permitiu o crescimento dos mesmos em todos os tempos testados.

Clorexidina líquida 2% sob agitação, eliminou 100% dos microrganismos constituintes dos biofilmes em todos os tempos testados, contudo necessitou de 5 minutos para ser totalmente efetiva sem a agitação mecânica.

A clorexidina gel 2% necessitou de 15 minutos para ser 100% eficaz sob agitação mecânica e sem agitação necessitou de 60 minutos.

Tabela 1. Atividade antimicrobiana de todas substâncias químicas auxiliares testadas sob agitação mecânica (em UFC).

Tempo	CLX gel 2%	CLX líquida 2%	NaOCl 2,5%	NaOCl 5,25%
30 segundos (30 s)	$1,60 \times 10^5$	0	$5,6 \times 10^4$	0
5 minutos (300 s)	$1,12 \times 10^3$	0	0	0
10 minutos (600 s)	$5,60 \times 10^2$	0	0	0
15 minutos (900 s)	0	0	0	0
30 minutos (1800 s)	0	0	0	0
1 hora (3600 s)	0	0	0	0

CLX =Clorexidina, NaOCl = Hipoclorito de Sódio

Crescimento até a diluição testada

Tabela 2. Atividade antimicrobiana de todas substâncias químicas auxiliares testadas sem agitação mecânica (em UFC).

Tempo	CLX gel 2%	CLX líquida 2%	NaOCl 2,5%	NaOCl 5,25%
30 segundos (30 s)	$5,60 \times 10^7$	$1,40 \times 10^3$	$5,60 \times 10^6$	0
5 minutos (300 s)	$6,00 \times 10^5$	0	$5,60 \times 10^3$	0
10 minutos (600 s)	$6,00 \times 10^4$	0	$5,60 \times 10^2$	0
15 minutos (900 s)	$5,60 \times 10^3$	0	$5,60 \times 10^2$	0
30 minutos (1800 s)	1	0	$5,60 \times 10^2$	0
1 hora (3600 s)	0	0	$5,60 \times 10^2$	0

CLX =Clorexidina, NaOCl = Hipoclorito de Sódio

Crescimento até a diluição testada

5.2. Tempo máximo necessário para as substâncias químicas auxiliares eliminarmos microrganismos testados (Tabelas 3 e 4).

O NaOCl 5,25% foi a substância química auxiliar que menos tempo levou para eliminar todos os microrganismos formadores dos biofilmes, necessitando de 30 segundos, tanto sob ou sem agitação mecânica.

NaOCl 2,5% necessitou de 5 minutos sob agitação mecânica para ser 100% efetivo, e sem o uso da agitação mecânica não conseguiu ser efetivo nos tempos testados, sendo os seus dados censurados durante a análise estatística.

Clorexidina líquida 2%, sob agitação mecânica, necessitou de um tempo máximo de 30 segundos, enquanto que sem agitação gastou 5 minutos.

Clorexidina gel 2% levou de 15 e 60 minutos para eliminar todos os microrganismos, com ou sem agitação, respectivamente.

Tabela 3. Tempo máximo (em segundos) necessário para as substâncias químicas eliminarem os microrganismos testados sob agitação mecânica.

Substâncias								
Químicas	Pi	Pe	Pg	Fn	Ca	Ef	Sa	T. Max
CLX Gel 2%	30	30	30	30	900	300	600	900
CLX Líquida 2%	30	30	30	30	30	30	30	30
NaOCl 2,5%	30	30	30	30	300	30	300	300
NaOCl 5,25%	30	30	30	30	30	30	30	30

T. Max = tempo máximo geral 300=5 min; 600=10min; 900=15min; 1800=30 min; 3600=60 min.

Pi (*Prevotella intermedia*) ; Pe (*Porphyromonas endodontalis*) ; Pg (*Porphyromonas gingivalis*) ; Fn (*Fusobacterium nucleatum*) ; Ca (*Candida albicans*) ; Ef (*Enterococcus faecalis*) ; Sa (*Staphylococcus aureus*).

Tabela 4. Tempo máximo (em segundos) necessário para as substâncias químicas eliminarem os microrganismos testados sem agitação mecânica.

Substâncias								
Químicas	Pi	Pe	Pg	Fn	Ca	Ef	Sa	T. Max
CLX Gel 2%	30	30	30	30	1800	1800	3600	3600
CLX Líquida 2%	30	30	30	30	300	30	300	300
NaOCl 2,5%	30	30	30	30	300	3600(*)	30	3600(*)
NaOCl 5,25%	30	30	30	30	30	30	30	30

T.Max = tempo máximo geral 300=5 min; 600=10min; 900=15min; 1800=30 min; 3600=60 min.

(*): dado censurado

Pi (*Prevotella intermedia*) ; Pe (*Porphyromonas endodontalis*) ; Pg (*Porphyromonas gingivalis*) ; Fn (*Fusobacterium nucleatum*) ; Ca (*Candida albicans*) ; Ef (*Enterococcus faecalis*) ; Sa (*Staphylococcus aureus*).

5.3. Suscetibilidade dos microrganismos testados às substâncias químicas auxiliares (Tabelas 5 e 6).

Sob agitação mecânica, o biofilme formado pela *C. albicans* foi o que demonstrou maior resistência à ação das substâncias testadas, necessitando de 15 minutos para ser eliminado. O segundo biofilme mais resistente foi o formado pelo *S. aureus* que necessitou de 10 minutos de contato com as substâncias químicas auxiliares. O terceiro biofilme mais resistente foi o formado pelo *E. faecalis*, que necessitou de 5 minutos para ser eliminado.

O biofilme formado por *E. faecalis* mostrou-se ser mais resistente sem a aplicação da agitação mecânica, não sendo eliminado durante os tempos testados, seguido do formado por *S. aureus* e por *C. albicans* que necessitaram de 30 minutos em contato com as substâncias químicas auxiliares para serem eliminados.

Biofilmes formados por *P. endodontalis*, *P. intermedia*, *P. gingivalis* e *F. nucleatum* foram eliminados 100% em 30 segundos de contato com as substâncias químicas auxiliares, com ou sem agitação mecânica.

Tabela 5. Suscetibilidade dos microrganismos testados frente às substâncias químicas auxiliares sob agitação mecânica (em UFC).

Tempo	Pi#	Pe#	Pg#	Fn#	Ca#	Ef#	Sa#
30 segundos (30s)	0	0	0	0	$1,00 \times 10^5$	$2,00 \times 10^4$	$2,00 \times 10^5$
5 minutos (300 s)	0	0	0	0	$1,00 \times 10^3$	0	$1,00 \times 10^3$
10 minutos (600 s)	0	0	0	0	$1,00 \times 10^3$	0	0
15 minutos (900 s)	0	0	0	0	0	0	0
30 minutos (1800 s)	0	0	0	0	0	0	0
1 hora (3600 s)	0	0	0	0	0	0	0

Pi (*Prevotella intermedia*); Pe (*Porphyromonas endodontalis*); Pg (*Porphyromonas gingivalis*); Fn (*Fusobacterium nucleatum*); Ca (*Candida albicans*); Ef (*Enterococcus faecalis*); Sa (*Staphylococcus aureus*)
 # Crescimento até a diluição testada.

Tabela 6. Suscetibilidade dos microrganismos testados às substâncias químicas auxiliares sem agitação mecânica (em UFC).

Tempo	Pi#	Pe#	Pg#	Fn#	Ca#	Ef#	Sa#
30 segundos (30 s)	0	0	0	0	$1,00 \times 10^5$	$3,00 \times 10^5$	$1,00 \times 10^8$
5 minutos (300 s)	0	0	0	0	$1,00 \times 10^3$	$2,08 \times 10^5$	$1,00 \times 10^6$
10 minutos (600 s)	0	0	0	0	$1,00 \times 10^3$	$1,08 \times 10^3$	$1,00 \times 10^3$
15 minutos (900 s)	0	0	0	0	$1,00 \times 10^3$	$1,08 \times 10^3$	$1,00 \times 10^3$
30 minutos (1800 s)	0	0	0	0	0	$1,00 \times 10^3$	2
1 hora (3600 s)	0	0	0	0	0	$2,00 \times 10^2$	0

Pi (*Prevotella intermedia*); Pe (*Porphyromonas endodontalis*); Pg (*Porphyromonas gingivalis*); Fn (*Fusobacterium nucleatum*); Ca (*Candida albicans*); Ef (*Enterococcus faecalis*); Sa (*Staphylococcus aureus*).
 # Crescimento até a diluição testada.

5.4. Suscetibilidade dos microrganismos frente a todas as substâncias químicas testadas, com e sem agitação mecânica.

5.4.1. *Prevotella intermedia* (Tabelas 7 e 8).

P. intermedia foi 100% suscetível frente as substâncias químicas testadas em todos os tempos testados, com e sem agitação mecânica.

Tabela 7. Suscetibilidade de *P. intermedia* frente às substâncias químicas testadas - com agitação.

Tempo	Controle#	CLX gel 2%#	CLX líquida 2%#	NaOCl 2,5%#	NaOCl 5,25%#
30	1,00 E-04	0	0	0	0
300	1,00 E-04	0	0	0	0
600	1,00 E-04	0	0	0	0
900	1,00 E-03	0	0	0	0
1800	0,01	0	0	0	0
3600	0,01	0	0	0	0

Tempo = segundos; 30=30s; 300=5 min; 600=10min; 900=15min; 1800=30 min; 3600=60 min.

Crescimento até a diluição testada

CLX =Clorexidina, NaOCl = Hipoclorito de Sódio

Tabela 8. Suscetibilidade de *P. intermedia* frente às substâncias químicas testadas – sem agitação.

Tempo	Controle#	CLX gel 2%#	CLX líquida 2%#	NaOCl 2,5%#	NaOCl 5,25%#
30	1,00 E-04	0	0	0	0
300	1,00 E-04	0	0	0	0
600	1,00 E-04	0	0	0	0
900	1,00 E-03	0	0	0	0
1800	0,01	0	0	0	0
3600	0,01	0	0	0	0

Tempo = segundos; 30=30s; 300=5 min; 600=10min; 900=15min; 1800=30 min; 3600=60 min.

#Crescimento até a diluição testada

CLX=Clorexidina, NaOCl=Hipoclorito de Sódio

5.4.2. Suscetibilidade de *P. endodontalis* frente às substâncias químicas testadas, com e sem agitação mecânica (Tabelas 9 e 10).

P. endodontalis foi eliminado em sua totalidade, em todos os tempos testados e com todas as soluções irrigantes testados, com e sem agitação mecânica.

Tabela 9. Suscetibilidade *P. endodontalis* frente às substâncias químicas testadas -com agitação.

Tempo	Controle#	CLX gel 2%#	CLX líquida 2%#	NaOCl 2,5%#	NaOCl 5,25%#
30	1,00 E-04	0	0	0	0
300	1,00 E-04	0	0	0	0
600	1,00 E-04	0	0	0	0
900	1,00 E-03	0	0	0	0
1800	1,001	0	0	0	0
3600	0,01	0	0	0	0

Tempo = segundos; 30=30s; 300=5 min; 600=10min; 900=15min; 1800=30 min; 3600=60 min.

CLX =Clorexidina, NaOCl = Hipoclorito de Sódio# Crescimento até a diluição testada

Tabela 10. Suscetibilidade *P. endodontalis* frente às substâncias químicas testadas – sem agitação.

Tempo	Controle#	CLX gel 2%#	CLX líquida 2%#	NaOCl 2,5%#	NaOCl 5,25%#
30	1,00 E-04	0	0	0	0
300	1,00 E-04	0	0	0	0
600	1,00 E-04	0	0	0	0
900	1,00 E-03	0	0	0	0
1800	1,001	0	0	0	0
3600	0,01	0	0	0	0

Tempo = segundos; 30=30s; 300=5 min; 600=10min; 900=15min; 1800=30 min; 3600=60 min.

CLX =Clorexidina, NaOCl = Hipoclorito de Sódio # Crescimento até a diluição testada

5.4.3. Suscetibilidade de *P. gingivalis* frente às substâncias químicas testadas, com e sem agitação mecânica (Tabelas 11 e 12).

P. gingivalis foi 100% suscetível frente a todos às substâncias químicas testadas em todos os tempos, com e sem agitação mecânica.

Tabela 11. Suscetibilidade *P. gingivalis* frente às substâncias químicas testadas-com agitação.

Tempo	Controle#	CLX gel 2%#	CLX líquida 2%#	NaOCl 2,5%#	NaOCl 5,25%#
30	1,00 E-05	0	0	0	0
300	1,00 E-04	0	0	0	0
600	1,00 E-04	0	0	0	0
900	1,00 E-03	0	0	0	0
1800	0,001	0	0	0	0
3600	0,1	0	0	0	0

Tempo = segundos; 30=30s; 300=5 min; 600=10min; 900=15min; 1800=30 min; 3600=60 min.

CLX =Clorexidina, NaOCl = Hipoclorito de Sódio # Crescimento até a diluição testada

Tabela 12. Suscetibilidade *P. gingivalis* frente às substâncias químicas testadas-sem agitação.

Tempo	Controle#	CLX gel 2%#	CLX líquida 2%#	NaOCl 2,5%#	NaOCl 5,25%#
30	1,00 E-05	0	0	0	0
300	1,00 E-04	0	0	0	0
600	1,00 E-04	0	0	0	0
900	1,00 E-03	0	0	0	0
1800	0,001	0	0	0	0
3600	0,1	0	0	0	0

Tempo = segundos; 30=30s; 300=5 min; 600=10min; 900=15min; 1800=30 min; 3600=60 min.

CLX =Clorexidina, NaOCl = Hipoclorito de Sódio # Crescimento até a diluição testada

5.4.4. Suscetibilidade de *F. nucleatum* frente às substâncias químicas testados, com e sem agitação mecânica (Tabelas 13 e 14).

F. nucleatum foi eliminado em sua totalidade, em todos os tempos testados e com todas as substâncias químicas testadas, com e sem agitação mecânica.

Tabela 13. Suscetibilidade *F. nucleatum* frente às substâncias químicas testadas - com agitação.

Tempo	Controle#	CLX gel 2%#	CLX líquida 2%#	NaOCl 2,5%#	NaOCl 5,25%#
30	1,00 E-10	0	0	0	0
300	1,00 E-06	0	0	0	0
600	1,00 E-06	0	0	0	0
900	1,00 E-06	0	0	0	0
1800	0,001	0	0	0	0
3600	0,001	0	0	0	0

Tempo = segundos; 30=30s; 300=5 min; 600=10min; 900=15min; 1800=30 min; 3600=60 min.

CLX =Clorexidina, NaOCl = Hipoclorito de Sódio # Crescimento até a diluição testada

Tabela 14. Suscetibilidade *F. nucleatum* frente às substâncias químicas testadas - sem agitação.

Tempo	Controle#	CLX gel 2%#	CLX líquida 2%#	NaOCl 2,5%#	NaOCl 5,25%#
30	1,00 E-10	0	0	0	0
300	1,00 E-06	0	0	0	0
600	1,00 E-06	0	0	0	0
900	1,00 E-06	0	0	0	0
1800	0,001	0	0	0	0
3600	0,001	0	0	0	0

Tempo = segundos; 30=30s; 300=5 min; 600=10min; 900=15min; 1800=30 min; 3600=60 min.

CLX =Clorexidina, NaOCl = Hipoclorito de Sódio # Crescimento até a diluição testada

5.4.5. Suscetibilidade de *C. albicans* frente às substâncias químicas testadas, com e sem agitação mecânica (Tabelas 15 e 16).

Sob agitação mecânica, o biofilme formado pela *C. albicans* se mostrou mais resistente a clorexidina gel 2%, onde obteve crescimento de 10^{-2} em 600 segundos (10 minutos) de contato, seguido do hipoclorito de sódio 2,5% que permitiu crescimento de 10^{-2} no tempo de 30 segundos.

C. albicans foi 100% eliminada em 30 segundos de contato com hipoclorito de sódio 5,25% e com a clorexidina líquida 2%.

Sem agitação mecânica, *C. albicans* se mostrou mais resistente frente a clorexidina gel 2%, onde obteve crescimento na diluição de 10^{-2} em 900 segundos (15 minutos) de contato, seguido do hipoclorito de sódio 2,5% e da clorexidina líquida 2% onde obteve crescimento na diluição de 10^{-2} em 300 segundos (5 minutos) de contato.

O hipoclorito de sódio 5,25% não permitiu o crescimento da *C. albicans*, sem agitação mecânica, em nenhum tempo testado.

Tabela 15. Suscetibilidade *C. albicans* frente às substâncias químicas testadas com agitação.

Tempo	Controle#	CLX gel 2%#	CLX líquida 2%#	NaOCl 2,5%#	NaOCl 5,25%#
30	1,00E-10	0,0001	0	0,01	0
300	1,00E-08	0,01	0	0	0
600	1,00E-06	0,01	0	0	0
900	1,00E-04	0	0	0	0
1800	0,01	0	0	0	0
3600	0,01	0	0	0	0

Tempo = segundos; 30=30s; 300=5 min; 600=10min; 900=15min; 1800=30 min; 3600=60 min.

CLX =Clorexidina, NaOCl = Hipoclorito de Sódio # Crescimento até a diluição testada

Tabela 16. Suscetibilidade *C. albicans* frente às substâncias químicas testadas sem agitação.

Tempo	Controle#	CLX gel 2%#	CLX líquida 2%#	NaOCl 2,5%#	NaOCl 5,25%#
30	1,00E-10	0,0001	0,01	0,01	0
300	1,00E-08	0,01	0	0	0
600	1,00E-06	0,01	0	0	0
900	1,00E-04	0,01	0	0	0
1800	0,01	0	0	0	0
3600	0,01	0	0	0	0

Tempo = segundos; 30=30s; 300=5 min; 600=10min; 900=15min; 1800=30 min; 3600=60 min.

CLX =Clorexidina, NaOCl = Hipoclorito de Sódio # Crescimento até a diluição testada

5.4.6. Suscetibilidade de *E. faecalis* frente às substâncias químicas testadas, com e sem agitação mecânica (Tabelas 17 e 18).

Sob agitação mecânica, o biofilme formado pelo *E. faecalis* se mostrou mais resistente frente a clorexidina gel 2%, onde obteve crescimento na diluição de 10^{-4} em 30 segundos de contato.

E. faecalis foi 100% eliminado em 30 segundos de contato com hipoclorito de sódio 5,25% e 2,5% e com a clorexidina líquida 2%.

Sem agitação mecânica, *E. faecalis* se mostrou mais resistente frente ao hipoclorito de sódio 2,5%, onde obteve crescimento em todos os tempos testados. Na clorexidina gel 2% teve crescimento na diluição de 10^{-1} até 900 segundos (15 minutos).

O hipoclorito de sódio 5,25% e a clorexidina líquida 2% não permitiram o crescimento de *E. faecalis* sem agitação mecânica, em nenhum tempo testado.

Tabela 17. Suscetibilidade *E. faecalis* frente às substâncias químicas testadas - com agitação.

Tempo	Controle#	CLX gel 2%#	CLX líquida 2%#	NaOCl 2,5%#	NaOCl 5,25%#
30	1,00E-09	0,0001	0	0	0
300	1,00E-07	0	0	0	0
600	1,00E-06	0	0	0	0
900	1,00E-06	0	0	0	0
1800	0,00001	0	0	0	0
3600	0,01	0	0	0	0

Tempo = segundos; 30=30s; 300=5 min; 600=10min; 900=15min; 1800=30 min; 3600=60 min

CLX =Clorexidina, NaOCl = Hipoclorito de Sódio # Crescimento até a diluição testada

Tabela 18. Suscetibilidade *E. faecalis* frente às substâncias químicas testadas - sem agitação.

Tempo	Controle#	CLX gel 2%#	CLX líquida 2%#	NaOCl 2,5%#	NaOCl 5,25%#
30	1,00E-09	0,0001	0	0,0001	0
300	1,00E-07	0,0001	0	0,001	0
600	1,00E-06	0,1	0	0,01	0
900	1,00E-06	0,1	0	0,01	0
1800	0,00001	0	0	0,01	0
3600	0,01	0	0	0,01	0

Tempo = segundos; 30=30s; 300=5 min; 600=10min; 900=15min; 1800=30 min; 3600=60 min.

CLX =Clorexidina, NaOCl = Hipoclorito de Sódio # Crescimento até a diluição testada

5.4.7. Suscetibilidade de *S. aureus* frente às substâncias químicas testadas, com e sem agitação mecânica (Tabelas 19 e 20).

Sob agitação mecânica, o biofilme formado por *S.aureus* se mostrou mais resistente frente a clorexidina gel 2%, onde obteve crescimento na diluição de 10^{-2} em 5 minutos de contato, seguido do hipoclorito de sódio 2,5% que permitiu o crescimento na diluição de 10^{-4} em 30 segundos

Hipoclorito de sódio 5,25% e a clorexidina líquida 2% não permitiram o crescimento do *S. aureus* em nenhum tempo testado.

Sem agitação mecânica, o biofilme de *S. aureus* se mostrou mais resistente frente a clorexidina gel 2%, onde obteve crescimento na diluição de 10^{-1} em 30 minutos de contato.

O hipoclorito de sódio 5,25% e 2,5% e a clorexidina líquida 2% não permitiram o crescimento do *S. aureus* em nenhum tempo testado sem agitação mecânica.

Tabela 19. Suscetibilidade *S. aureus* frente às substâncias químicas testadas - com agitação.

Tempo	Controle#	CLX gel 2%#	CLX líquida 2%#	NaOCl 2,5%#	NaOCl 5,25%#
30	1,00E-09	0,0001	0	0,0001	0
300	1,00E-07	0,01	0	0	0
600	1,00E-06	0	0	0	0
900	1,00E-05	0	0	0	0
1800	0,01	0	0	0	0
3600	0,01	0	0	0	0

Tempo = segundos; 30=30s; 300=5 min; 600=10min; 900=15min; 1800=30 min; 3600=60 min.

CLX =Clorexidina, NaOCl = Hipoclorito de Sódio # Crescimento até a diluição testada

Tabela 20. Suscetibilidade *S. aureus* frente às substâncias químicas testadas - sem agitação

Tempo	Controle#	CLX gel 2%#	CLX líquida 2%#	NaOCl 2,5%#	NaOCl 5,25%#
30	1,00E-09	0,0000001	0	0	0
300	1,00E-07	0,00001	0	0	0
600	1,00E-06	0,0001	0	0	0
900	1,00E-05	0,001	0	0	0
1800	0,01	0,1	0	0	0
3600	0,01	0	0	0	0

Tempo = segundos; 30=30s; 300=5 min; 600=10min; 900=15min; 1800=30 min; 3600=60 min.

CLX =Clorexidina, NaOCl = Hipoclorito de Sódio # Crescimento até a diluição testada

5.5. Tempo máximo das substâncias químicas auxiliares testadas através do Teste de Friedman (Tabelas 21 e 22)

Através do teste de Friedman, utilizando-se os dados das tabelas 5 e 6, foram avaliadas as diferenças entre as substâncias químicas auxiliares, considerando os microrganismos como blocos. Para realizar essa análise, os dados foram transformados em postos, dentro de cada bloco, com o menor valor recebendo o posto 1, o segundo menor valor o posto 2, e assim por diante. As comparações múltiplas, quando foi constatada significância para o teste de Friedman, foram feitas utilizando-se a metodologia indicada em Pontes (2000) e Pontes & Corrente (2001).

Na tabela 21, onde é utilizada a agitação mecânica, o teste de Friedman indica que há diferenças significativas entre os irrigantes. (p -valor exato= 0,02088 < 0,05). O p -valor assintótico, utilizando a distribuição de Qui-quadrado, é igual a 0,041. As comparações múltiplas indicam que a Clorexidina gel 2% difere da Clorexidina líquida 2% e do NaOCl 5,25%, mas não difere do NaOCl 2,5%. Por outro lado, os testes de comparações múltiplas não indicam diferenças entre os tempos para o NaOCl 2,5% e as outras substâncias químicas auxiliares utilizadas.

Na tabela 22, onde as substâncias químicas auxiliares foram utilizadas sem agitação mecânica, o teste de Friedman não indica diferença significativa entre os irrigantes (p -valor = 0,1051). Por esse motivo, não foram feitas as comparações múltiplas. Observa-se que o dado censurado, por ser o maior valor dentro do bloco

(microrganismo *E.faecalis*), pode ser utilizado, pois a censura, no caso presente, é censura à direita, o que indica que o tempo é simplesmente maior que 3600 segundos. Assim, o posto do referido dado é o maior para aquele microrganismo.

Observa-se que o teste de Friedman não é o teste ideal para este tipo de informação, especialmente neste caso em que quatro microrganismos têm o mesmo tempo máximo para serem eliminados. Ou seja, apenas os outros três microrganismos trazem informações importantes para o teste, e amostras com três elementos não apresentam, em geral, resultados conclusivos. Além disso, o teste de Friedman, como todos os testes não-paramétricos, utiliza os postos e não os valores reais. Assim, grandes diferenças de tempo são ignoradas, importando apenas a ordem em que elas aparecem. O teste de médias para os valores não transformados também não se adequa a esse tipo de dado devido à grande diferença existente entre os valores, que pode gerar variâncias muito grandes. Uma opção que pode ser utilizada é realizar a transformação dos dados, utilizando a função logarítmica. Entretanto, com o uso desta função os resultados não se modificam (ver Anexo 4). Outra opção, bastante difundida atualmente, é a utilização das técnicas da Análise de Sobrevida.

Tabela 21. Tempo de sobrevivência máximo (em segundos) e seus respectivos postos (em parêntesis), por substância química e para cada um dos microrganismos, com agitação mecânica.

Substância química	Pi	Pe	Pg	Fn	Ca	Ef	Sa	
CLX gel 2%	30(2,5)	30(2,5)	30 (2,5)	30 (2,5)	900(4,0)	300(4,0)	600 (4,0)	A
CLX Líquida 2%	30(2,5)	30(2,5)	30 (2,5)	30 (2,5)	30 (1,5)	30 (2,0)	30 (1,5)	AB
NaOCl 2,5%	30(2,5)	30(2,5)	30 (2,5)	30 (2,5)	300(3,0)	30 (2,0)	300 (3,0)	B
NaOCl 5,25%	30(2,5)	30(2,5)	30 (2,5)	30 (2,5)	30 (1,5)	30 (2,0)	30 (1,5)	B

Diferentes letras significam diferentes valores (de A a B) (Friedman test $p=0.02088 < 0.05$)

Pi (*Prevotella intermedia*) ; Pe (*Porphyromonas endodontalis*) ; Pg (*Porphyromonas gingivalis*) ; Fn (*Fusobacterium nucleatum*) ; Ca (*Candida albicans*) ; Ef (*Enterococcus faecalis*) ; Sa (*Staphylococcus aureus*).

CLX =Clorexidina, NaOCl = Hipoclorito de Sódio

Tabela 22 . Tempo de sobrevivência máximo e seus respectivos postos (em parêntesis), por substância química e para cada um dos microrganismos, sem agitação mecânica.

Substância química	Pi	Pe	Pg	Fn	Ca	Ef	Sa	
CLX gel 2%	30(2,5)	30(2,5)	30(2,5)	30(2,5)	1800 (4,0)	1800 (3,0)	3600 (4,0)	A
CLX Líquida 2%	30(2,5)	30(2,5)	30(2,5)	30(2,5)	300 (2,5)	30 (1,5)	30 (2,0)	A
NaOCl 2,5%	30(2,5)	30(2,5)	30(2,5)	30(2,5)	300 (2,5)	> 3600 (4,0)	30 (2,0)	A
NaOCl 5,25%	30(2,5)	30(2,5)	30(2,5)	30(2,5)	30 (1,0)	30 (1,5)	30 (2,0)	A

Letras iguais significam mesmos valores (A) (Friedman test $p=0.1051 > 0.05$)

Pi (*Prevotella intermedia*) ; Pe (*Porphyromonas endodontalis*) ; Pg (*Porphyromonas gingivalis*) ; Fn (*Fusobacterium nucleatum*) ; Ca (*Candida albicans*) ; Ef (*Enterococcus faecalis*) ; Sa (*Staphylococcus aureus*).

CLX =Clorexidina, NaOCl = Hipoclorito de Sódio

5.6. Análise de sobrevivência dos microrganismos frente às substâncias químicas testadas, com agitação mecânica (tabelas 23 a 32).

Foram utilizados as curvas de Sobrevivência e de Hazard para a análise de sobrevivência não-paramétrica dos dados, e o teste do logrank para verificar diferenças entre as curvas (tratamentos) para cada uma das situações, ou seja, com e sem agitação mecânica. Os sete microrganismos, neste caso, foram estudados conjuntamente. Foram considerados os eventos de eliminação ou não dos microrganismos, em cada tempo.

5.6.1. Clorexidina gel

A tabela 23 demonstra a curva de sobrevivência dos microrganismos, sob agitação mecânica, frente à utilização da clorexidina gel 2%. No tempo de 30 segundos os microrganismos *P. intermedia*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis* e *F.nucleatum* foram 100% eliminados, restando os microrganismos *C. albicans*, *E. faecalis* e *S. aureus*.

Em 5 minutos o *E. faecalis* foi eliminado pela clorexidina gel 2%, sobrevivendo a *C. albicans* e o *S. aureus*. Em 10 minutos, o *S. aureus* foi 100% eliminado e em 15 minutos a *C. albicans*.

Tabela 23. Sobrevivência de microrganismos frente a Clorexidina gel 2% com agitação

Tempo (em segundos)	Microrganismos Eliminados	Sobrevivência Acumulada (%)	Eventos Acumulados	Microrganismos Restantes
30	Pi, Pe, Pg, Fn	0,4286	Pi, Pe, Pg, Fn	Ca, Sa, Ef
300	Ef	0,2857	Pi, Pe, Pg, Fn, Ef	Ca, Sa
600	Sa	0,1429	Pi,Pe,Pg,Fn,Ef,Sa	Ca
900	Ca	0,0000	Pi,Pe,Pg,Fn,Ef,Sa,Ca	-

Pi (*Prevotella intermedia*) ; Pe (*Porphyromonas endodontalis*) ; Pg (*Porphyromonas gingivalis*) ; Fn (*Fusobacterium nucleatum*) ; Ca (*Candida albicans*) ; Ef (*Enterococcus faecalis*) ; Sa (*Staphylococcus aureus*).

5.6.2. Clorexidina líquida

A tabela 24 descreve a curva de sobrevivência dos microrganismos, sob agitação mecânica, frente à utilização da clorexidina líquida 2%. No tempo de 30 segundos todos os microrganismos (*P. intermedia*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *F.nucleatum*, *C. albicans*, *E. faecalis* e *S. aureus*) foram 100% eliminados.

Tabela 24. Sobrevivência de microrganismos frente a clorexidina líquida 2% com agitação

Tempo (em segundos)	Microrganismos Eliminados	Sobrevivência Acumulada (%)	Eventos Acumulados	Microrganismos Restantes
30	Todos	0,0000	Pi,Pe,Pg,Fn,Ef,Sa,Ca	-

Pi (*Prevotella intermedia*) ; Pe (*Porphyromonas endodontalis*) ; Pg (*Porphyromonas gingivalis*) ; Fn (*Fusobacterium nucleatum*) ; Ca (*Candida albicans*) ; Ef (*Enterococcus faecalis*) ; Sa (*Staphylococcus aureus*).

5.6.3. NaOCl 2,5%

A curva de sobrevivência dos microrganismos demonstrada na tabela 23, sob agitação mecânica, frente à utilização do NaOCl 2,5% mostra o seguinte resultado: em 30 segundos de contato com a solução teste, os microrganismos *P. intermedia*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *F.nucleatum* e o *E. faecalis* foram 100% eliminados, restando os microrganismos *C. albicans* e o *S. aureus*.

Em 5 minutos a *C. albicans* e o *S. aureus* foram 100% eliminados.

Tabela 25. Sobrevivência de microrganismos frente ao NaOCl 2,5% com agitação

Tempo (em segundos)	Microrganismos Eliminados	Sobrevivência Acumulada (%)	Eventos Acumulados	Microrganismos Restantes
30	Pi, Pe, Pg, Fn, Ef	0,2857	Pi, Pe, Pg, Fn, Ef	Ca, Sa
300	Sa, Ca	0,0000	Pi,Pe,Pg,Fn,Ef,Ca,Sa	-

Pi (*Prevotella intermedia*) ; Pe (*Porphyromonas endodontalis*) ; Pg (*Porphyromonas gingivalis*) ; Fn (*Fusobacterium nucleatum*) ; Ca (*Candida albicans*) ; Ef (*Enterococcus faecalis*) ; Sa (*Staphylococcus aureus*).

5.6.4. NaOCl 5,25%

A tabela 26 demonstra que 100% dos microrganismos foram eliminados em 30 segundo de contato com o NaOCl 5,25% sob agitação mecânica

Tabela 26. Sobrevivência de microrganismos frente ao NaOCl 5,25% com agitação

Tempo (em segundos)	Microrganismos Eliminados	Sobrevivência Acumulada (%)	Eventos Acumulados	Microrganismos Restantes
30	Todos	0,0000	Pi,Pe,Pg,Fn,Ef,Sa,Ca	-

Pi (*Prevotella intermedia*) ; Pe (*Porphyromonas endodontalis*) ; Pg (*Porphyromonas gingivalis*) ; Fn (*Fusobacterium nucleatum*) ; Ca (*Candida albicans*) ; Ef (*Enterococcus faecalis*) ; Sa (*Staphylococcus aureus*).

5.6.5. Médias, intervalos de confiança e medianas de cada uma das substâncias químicas testadas com agitação

A tabela 27 apresenta as médias, com seus respectivos limites dos intervalos de confiança (95%) e as medianas de cada um dos irrigantes testados. A estatística do teste utilizado (LogRank) é 7,76 (com 3 graus de liberdade), cujo p-valor (assintótico) é 0,0512. Se considerarmos o nível de significância de 5%, não há rejeição da hipótese de igualdade das curvas de sobrevivência. Entretanto, tal valor é extremamente próximo do limite de 5%, mesmo nesse caso em que temos poucos pontos considerados. Resultados como esse devem ser considerados de forma mais cautelosa, ou seja, não devem ser rejeitados de maneira imediata. As análises dos microrganismos feitas de forma individual podem ser esclarecedoras nessa discussão. Pode-se notar que o resultado assintótico apresentado pelo teste de Friedman (p-valor = 0,041), não é tão distante do valor apresentado pelo teste do logrank.

Tabela 27. Médias, desvios padrões e medianas, para cada substância química testada.

Substâncias químicas	Médias	Medianas	I.C. 95%	
			Limite Inferior	Limite Superior
CLX gel 2%	274	30	15	534
CLX líquida 2%	30	30	30	30
NaOCl 2,5%	107	30	10	205
NaOCl 5,25%	30	30	30	30

CLX = Clorexidina, NaOCl = Hipoclorito de Sódio

As figuras 5 e 6 mostram a curva de sobrevivência dos microrganismos e a curva de Hazard.

As curvas de sobrevivência referem-se ao percentual de microrganismos sobreviventes em cada etapa (aos 30, 300, 600, 900, 1800 e 3600 segundos). No caso da Clorexidina líquida 2% e do NaOCl 5,25% tem-se apenas uma reta aos 30 segundos indicando não haver sobrevivência de microrganismos na inspeção feita nesse tempo. Para o NaOCl 2,5% há sobrevivência de 28,57% dos microrganismos no tempo 30s e esta sobrevivência reduz-se a zero aos 5 minutos (300 segundos). Finalmente, para a Clorexidina gel 2%, os percentuais de sobrevivência são de 42,86%, 28,57%, 14,29% e 0,00% aos 30, 300, 600 e 900 segundos, indicando ser o agente irrigante menos eficaz entre os quatro estudados.

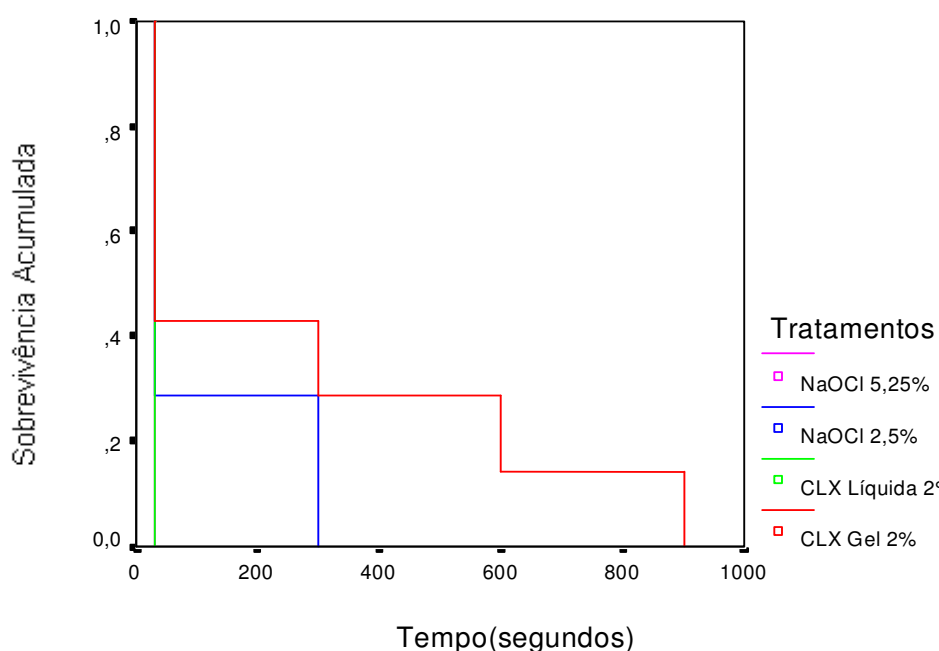


Figura 5 . Funções de Sobrevivência - Com agitação mecânica

O gráfico de Hazard indica os tempos de falha e suas respectivas taxas (ou percentuais). No presente caso, os tempos de falha correspondem à morte dos microrganismos e as taxas são os percentuais de microrganismos que foram eliminados (falharam) quando feita à observação naquele instante. Assim, para a Clorexidina líquida 2% e NaOCl 5,25%, a taxa de morte é 1,00 (100%) no instante medido 30 segundos. Para o cálculo dos valores a serem introduzidos no gráfico de Hazard, no caso da Clorexidina gel 2%, calculamos simplesmente a razão entre os os microrganismos que foram eliminados num intervalo de tempo dividido pelos que estão sob risco. Assim, os valores seriam: $\frac{3}{7}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{3}$, $\frac{1}{2}$ e 1, para os momentos 30, 300, 600 e 900, respectivamente. Para o NaOCl 2,5%, os valores são $\frac{1}{3}$ e 1, para os tempos 30 e 300.

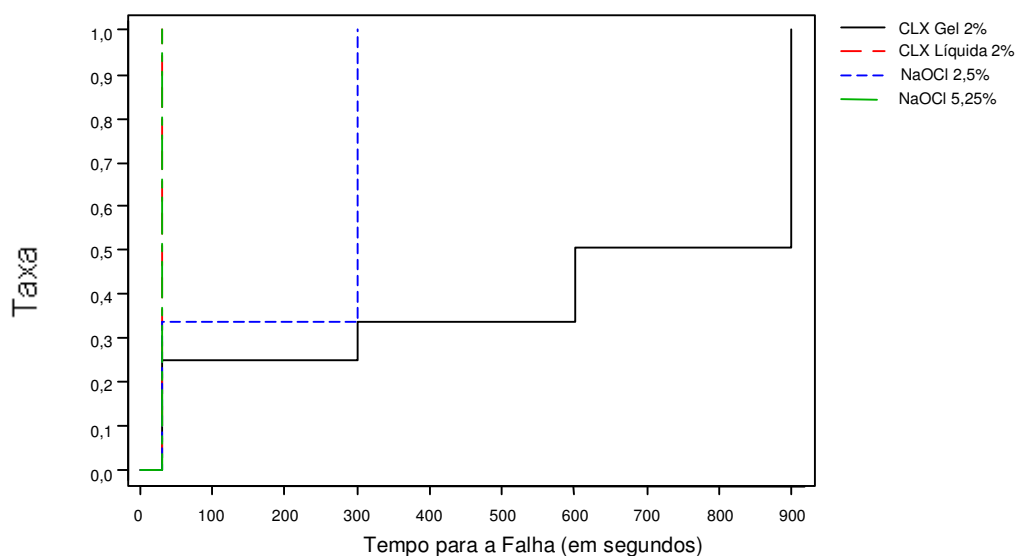


Figura 6. Gráfico de Hazard Não-paramétrico - com agitação
Empirical Hazard Function - Sem censura

5.7. Análise de sobrevivência dos microrganismos frente às substâncias químicas testadas, com agitação mecânica (tabelas 28 a 32).

Nas tabelas 28 a 31 são demonstrados a curva de sobrevivência para cada uma das quatro substâncias testadas, sem a agitação mecânica. Na tabela 32 têm-se as médias e seus respectivos intervalos de confiança a 95% e as medianas. O teste do LogRank demonstrou que não houveram diferenças significativas entre as curvas de sobrevivência das quatro substâncias químicas auxiliares, obtendo-se uma estatística igual a 5,15, cujo p-valor é igual a 0,1615 (maior que 5%).

As figuras 7 e 8 representam, respectivamente, as curvas de sobrevivência e de Hazard para os dados sem agitação mecânica.

5.7.1. Clorexidina gel 2%

A tabela 28 demonstra a curva de sobrevivência dos microrganismos, sem agitação mecânica, frente à utilização da clorexidina gel 2%. No tempo de 30 segundos os microrganismos *P. intermedia*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis* e *F.nucleatum* foram 100% eliminados, restando os microrganismos *C. albicans*, *E. faecalis* e *S. aureus*.

Em 30 minutos o *E. faecalis* e a *C. albicans* foram eliminados pela clorexidina gel 2%, sobrevivendo apenas o *S. aureus*. Em 60 minutos, o *S. aureus* foi 100% eliminado.

Tabela 28. Sobrevivência de microrganismos frente a clorexidina gel 2% sem agitação

Tempo (em segundos)	Microrganismos Eliminados	Sobrevivência Acumulada (%)	Eventos Acumulados	Microrganismos Restantes
30	Pi, Pe, Pg, Fn	0,4286	Pi, Pe, Pg, Fn	Ca, Sa, Ef
1800	Ca, Ef	0,1429	Pi,Pe,Pg,Fn,Ca,Ef	Sa
3600	Sa	0,0000	Pi,Pe,Pg,Fn,Ef,Sa,Ca	-

Pi (*Prevotella intermedia*) ; Pe (*Porphyromonas endodontalis*) ; Pg (*Porphyromonas gingivalis*) ; Fn (*Fusobacterium nucleatum*) ; Ca (*Candida albicans*) ; Ef (*Enterococcus faecalis*) ; Sa (*Staphylococcus aureus*).

5.7.2. Clorexidina líquida 2%

A curva de sobrevivência dos microrganismos demonstrado na tabela 29, sem agitação mecânica, frente à utilização da clorexidina líquida 2% mostra o seguinte resultado: em 30 segundos de contato com a solução teste, os microrganismos *P. intermedia*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *F.nucleatum*, *E. faecalis* e o *S. aureus* foram 100% eliminados, restando somente a *C. albicans* que foi eliminada em 5 minutos de contato com a solução química auxiliar.

Tabela 29. Sobrevivência de microrganismos frente a clorexidina líquida 2% sem agitação

Tempo (em segundos)	Microrganismos Eliminados	Sobrevivência Acumulada (%)	Eventos Acumulados	Microrganismos Restantes
30	Pi,Pe,Pg,Fn,Ef,Sa	0,1429	Pi,Pe,Pg,Fn,Ef,Sa	Ca
300	Ca	0,0000	Pi,Pe,Pg,Fn,Ef,Sa,Ca	

Pi (*Prevotella intermedia*) ; Pe (*Porphyromonas endodontalis*) ; Pg (*Porphyromonas gingivalis*) ; Fn (*Fusobacterium nucleatum*) ; Ca (*Candida albicans*) ; Ef (*Enterococcus faecalis*) ; Sa (*Staphylococcus aureus*).

5.7.3. NaOCl 2,5%

A tabela 30 demonstra a curva de sobrevivência dos microrganismos, sem agitação mecânica, frente à utilização do NaOCl 2,5%. No tempo de 30 segundos os microrganismos *P. intermedia*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *F.nucleatum* e *S. aureus* foram 100% eliminados, restando *E. faecalis* e *C. albicans*.

Em 5 minutos a *C. albicans* foi 100% eliminada. O *E. faecalis* resistiu a ação do NaOCl 2,5%, não sendo eliminado nos tempos utilizados neste teste.

Tabela 30. Sobrevivência de microrganismos frente ao NaOCl 2,5% sem agitação

Tempo (em segundos)	Microrganismos Eliminados	Sobrevivência Acumulada (%)	Eventos Acumulados	Microrganismos Restantes
30	Pi,Pe,Pg,Fn,Sa	0,2857	Pi, Pe, Pg, Fn, Sa	Ca, Ef
300	Ca, Ef	0,1429	Pi,Pe,Pg,Fn,Ca,Sa	Ef
3600	-	0,1429	Pi,Pe,Pg,Fn,Ca,Sa	Ef

Observação: uma censura (microrganismo *E. faecalis* não foi eliminado até o final do ensaio)

Pi (*Prevotella intermedia*) ; Pe (*Porphyromonas endodontalis*) ; Pg (*Porphyromonas gingivalis*) ; Fn (*Fusobacterium nucleatum*) ; Ca (*Candida albicans*) ; Ef (*Enterococcus faecalis*) ; Sa (*Staphylococcus aureus*).

5.7.3. NaOCl 5,25%

A tabela 31 demonstra que 100% dos microrganismos foram eliminados em 30 segundo de contato com o NaOCl 5,25% sem agitação mecânica.

Tabela 31. Sobrevivência de microrganismos frente ao NaOCl 5,25% sem agitação

Tempo (em segundos)	Microrganismos Eliminados	Sobrevivência Acumulada (%)	Eventos Acumulados	Microrganismos Restantes
30	Todos	0,0000	Pi,Pe,Pg,Fn,Ef,Sa,Ca	-

Pi (*Prevotella intermedia*) ; Pe (*Porphyromonas endodontalis*) ; Pg (*Porphyromonas gingivalis*) ; Fn (*Fusobacterium nucleatum*) ; Ca (*Candida albicans*) ; Ef (*Enterococcus faecalis*) ; Sa (*Staphylococcus aureus*).

5.7.5. Médias, intervalos de confiança e medianas de cada um das substâncias químicas testadas sem agitação

A tabela 32 apresenta as médias, com seus respectivos limites dos intervalos de confiança (95%) e as medianas de cada uma das substâncias químicas testadas.

Tabela 32. Médias, desvios padrões e medianas para cada substância química testada sem agitação.

substâncias químicas	Médias	Medianas	I.C. 95%	
			Limite Inferior	Limite Superior
CLX gel 2%	1046	30	7	2084
CLX líquida 2%	69	30	0	144
NaOCl 2,5%	579*	30*	0*	1495*
NaOCl 5,25%	30	30	30	30

Limitado a 3600 devido à censura.

CLX = Clorexidina, NaOCl = Hipoclorito de Sódio

O gráfico 3 mostra as curvas de sobrevivência dos microrganismos, sem agitação mecânica. As curvas de sobrevivência referem-se ao percentual de microrganismos que resistiram em cada tempo testado (aos 30, 300, 600, 900, 1800, 3600 segundos).

Na análise do **NaOCl 5,25%**, tem-se apenas uma reta aos 30 segundos indicando a efetividade da solução frente a todos os microrganismos testados. Para a **clorexidina líquida 2%** houve um percentual de 14,3% de sobrevivência dos microrganismos testados em 30 segundos. Aos 300 segundos (5 minutos) todos os microrganismos foram eliminados. A curva de sobrevivência do **NaOCl 2,5%** demonstrou que em 30 segundos de contatos com os microrganismos testados, houve uma sobrevivência de 28,57%, e de 14,3% aos 300 segundos. O *E. faecalis* mostrou-se resistente ao NaOCl 2,5% em todos os tempos testados (3600 segundos = 60 minutos), indicando para o estudo, uma censura neste ponto (cruz azul no gráfico de sobrevivência). Para a **clorexidina gel 2%** os percentuais de sobrevivência dos microrganismos testados foram de 42,86%, 14,29% e 0,00% aos 30, 1800, e 3600 segundos, respectivamente.

Estatisticamente, em termos relativos, a clorexidina gel 2% mostrou ser o irrigante menos efetivo. Contudo, em termos absolutos, o NaOCl 2,25% demonstrou ser a solução menos efetiva, por não conseguir a taxa zero de sobrevivência dentro dos tempos testados. Entretanto, o teste de Logrank, bem como o teste de Friedman, não revelam esta diferença já que as curvas de sobrevivência coincidem ou se cruzam em alguns pontos.

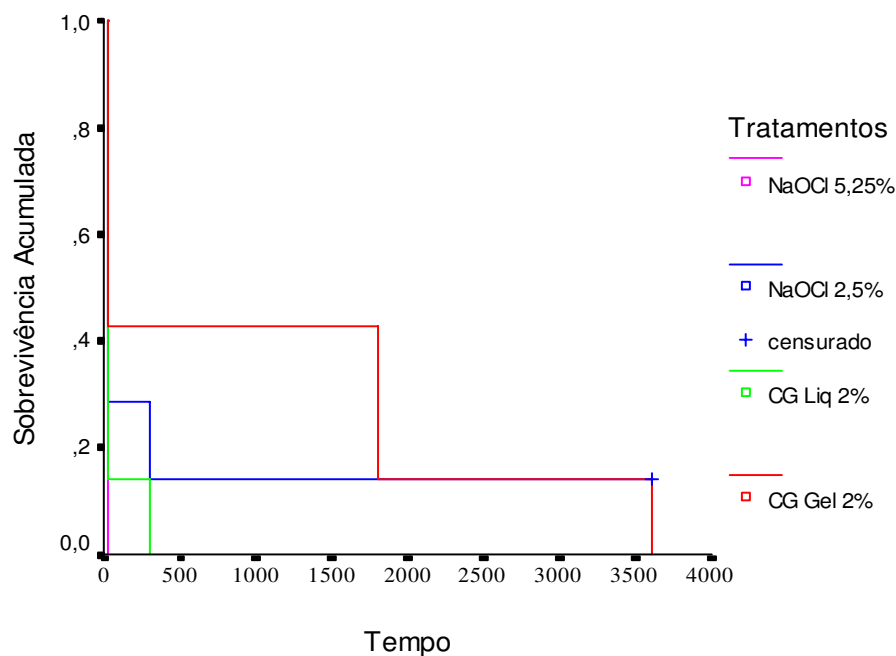


Figura 7. Funções de Sobrevivência - Sem agitação

O gráfico de Hazard utilizado para as substâncias químicas auxiliares sem agitação mecânica (Figura 8) demonstra o tempo em que os microrganismos foram mortos e seus respectivos percentuais. O NaOCl 5,25% obteve uma taxa de eliminação dos microrganismo de 1,00, ou seja 100% em 30 segundos de contato. Para a clorexidina líquida os valores encontrados foram de $\frac{1}{2}$ e 1 para os tempos de 30 e 300 segundos, respectivamente. Para o NaOCl 2,5%, os valores foram de $\frac{1}{3}$ e 1, para os tempos de 30 e 300 segundos. Para a clorexidina gel 2% os valores encontrados foram de $\frac{2}{7}$, $\frac{1}{2}$ e, para os tempos de 30, 1800 e 3600 segundos, respectivamente.

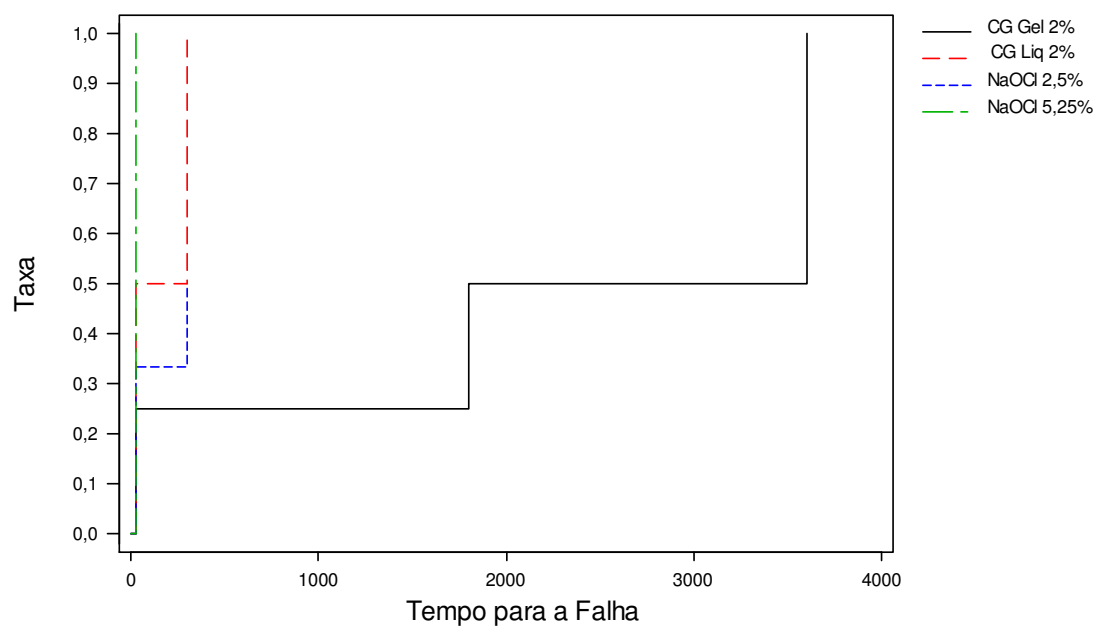


Figura 8. Gráfico de Hazard Não-paramétrico - sem agitação
Empirical Hazard Function - Com censura de um dado

É notório o papel do microrganismo como principal agente etiológico no desenvolvimento da doença pulpar e periapical e assim como sua responsabilidade no insucesso do tratamento endodôntico (Kakehashi *et al.*, 1965; Gomes *et al.*, 1996a, 2004; Nair *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 1992; Siqueira Jr, 2001)

Na natureza, a maioria dos microrganismos não existe como cultura pura de células que vivem livremente, e sim associados à superfície em parceria com várias espécies (El-Azizi *et al.*, 2004). Na cavidade oral, a microbiota normal se apresenta na forma de biofilme aderida à uma superfície (Pratten *et al.*, 1998).

Biofilme pode ser definido como uma comunidade complexa de microrganismos embebidos em uma matriz de exopolissacarídeo, cuja composição química é específica para cada espécie e é responsável por mediar a agregação e adesão dos microrganismos à superfície colonizada (Distel *et al.*, 2004; Kimberly, 2004; Costerton *et al.*, 1994).

Microrganismos, dentro do biofilme, podem resistir melhor a privações de nutrientes, mudanças de pH, radicais de oxigênio, desinfetantes e antibióticos que a sua forma planctônica. A invulnerabilidade do biofilme não é completamente entendida, mas se sabe que está associada às características específicas existentes no biofilme, tais como: crescimento lento, heterogenicidade fisiológica dos habitantes e a composição específica da matriz externa (Costerton, *et al.*, 1994; Kimberly, 2004).

Uma grande variedade de metodologias tem sido utilizada para testar a efetividade de agentes antimicrobianos em laboratório. Muitas vezes, os resultados mostram-se conflitantes em trabalhos que utilizaram as mesmas substâncias, os mesmos microrganismos e metodologias diferentes. Tais diferenças estão principalmente relacionadas ao contato direto entre a substância e o microrganismo testado. Métodos de estudo como Difusão em Agar e Contato Direto tem demonstrado maior facilidade na eliminação de microrganismos quando comparados a métodos que utilizam a contaminação *in vitro* de dentes extraídos (Shih *et al.*, 1970; Foley *et al.*, 1983). As condições utilizadas em laboratório para determinar a concentração inibitória mínima (MIC) não representam a realidade de crescimento, onde bactérias crescem em comunidade formando o biofilme (Wilson 1996).

Métodos *in vitro*, tais como: o método de diluição, que determina a quantidade de agente antimicrobiano necessária para inibir o crescimento do microrganismo testado; o método de difusão em ágar, que através da observação do halo de inibição permite observar o efeito da substância testada frente ao microrganismo testado; e o método de contato direto, que mostra informações qualitativas a respeito das substâncias (Estrela, 2000) apresentam vantagens e desvantagens. O método de diluição só pode ser utilizado por substâncias solúveis ao meio de cultura; o tamanho do halo de inibição formado no método de difusão em ágar está relacionado com a solubilidade e a difusibilidade da substância teste. O método de contato direto está relacionado com a efetividade da substância e com a sua exposição direta ao microrganismo (Estrela, 2000).

As bactérias estruturadas em biofilme se comportam de maneira diferente quando expostas às substâncias químicas. Esta diferença está relacionada ao tempo de exposição e a quantidade da substância, além da fase de desenvolvimento do biofilme (Spratt *et al.*, 2001).

A metodologia utilizada neste trabalho foi adaptada de Spratt *et al.*, (2001), onde o biofilme é gerado sobre uma membrana de nitrato de celulose e só então é levado cuidadosamente, em contato com a substância química auxiliar a ser testada. Em adição ao protocolo utilizado por Spratt *et al.*, (2001), o trabalho foi dividido em dois grupos: o primeiro foi realizado sob agitação mecânica, feita em vórtex, para simular a desestruturação do biofilme durante o preparo químico-mecânico; e o segundo grupo foi realizado sem a agitação. Este protocolo é fácil e rápido de ser realizado, e de grande valia para realização de testes comparativos entre microrganismos presentes no biofilme e suas formas planctônicas.

Os microrganismos utilizados neste estudo são encontrados nas infecções dos canais radiculares, participam na formação de biofilme, sendo alvo de vários estudos (Whittaker *et al.*, 1996; Kolenbrander, 2000; Gomes *et al.*, 2001; El-Azizi *et al.*, 2004; Hufnagel *et al.*, 2004; Siqueira & Sem, 2004; Vianna *et al.*, 2004).

Foram utilizados os aeróbios *Candida albicans* (NTCC 3736) e *Staphylococcus aureus*, o anaeróbio facultativo *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), e os anaeróbios estritos (isolados clinicamente dos canais radiculares) *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* e *Fusobacterium nucleatum*.

O tratamento endodôntico consiste na desinfecção do sistema de canal radicular, usando instrumentos modernos auxiliados por um agente antimicrobiano efetivo, antes da obturação.

Irrigantes e irrigação são extremamamente importantes para o debridamento do canal radicular. Para este ser efetivo, vários aspectos têm de ser considerados: lavagem, ação antimicrobiana e química, tipo de soluções e de sistema de irrigação (Walton 1982). Geralmente a ação da lavagem, que é a remoção física de debris do interior do canal radicular, deve ser realizada com salina estéril, que é muito mais similar aos flúidos teciduais que água destilada ou outros agentes químicos. Estudos têm demonstrado que os debris e os conteúdos bacterianos são reduzidos em quase 95% (Siqueira *et al.* 1999, Dametto *et al* in press) pela ação de lavagem com salina. Entretanto, sua efetividade está diretamente relacionada com o volume e a frequência de irrigação, como também com a profundidade da agulha irrigadora e da cânula aspiradora e do movimento de vai e vem dos dois. Neste estudo a salina tamponada, utilizada como substância controle, permitiu o crescimento bacteriano em todos os tempos testados, tanto com ou sem agitação mecânica.

Além do uso de salina como solução irrigadora, o uso de agentes químicos é necessário para dissolver tecidos orgânicos (e.g. NaOCl), reduzir irritantes inacessíveis a instrumentação durante o preparo do canal radicular (e.g. NaOCl, clorexidina), para amolecer dentina e remover smear layer (e.g. EDTA, ácido

cítrico) e agir como lubrificante durante a exploração ou negociação de canais constrictos (e.g. clorexidina gel, glicerina, cera).

Agentes químicos tais como NaOCl, clorexidina (em gel ou em solução), EDTA, deveriam ser usados como coadjuvantes durante o preparo químico-mecânico. O maior volume e pressão da seringa deveriam ser feitos com salina, para remover os debris. Como salina é muito mais biocompatível com os tecidos periapicais, causa menos dano aos tecidos periapicais quando extravasada pelo forame apical

As substâncias químicas auxiliares testadas no presente estudo foram o hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5 e 5,25% e Clorexidina gel e líquida 2%. Salina tamponada foi utilizada como solução controle.

O hipoclorito de sódio (NaOCl) tem sido utilizado na terapia endodôntica por mais de 70 anos, sendo um efetivo agente antimicrobiano contra a microbiota da cavidade oral, além de possuir propriedade de dissolução de tecido. É a substância auxiliar mais comumente utilizada durante o preparo químico-mecânico. Sua eficácia antimicrobiana está na sua capacidade de oxidar e hidrolisar proteínas celulares. Sua toxicidade está diretamente relacionada com a sua concentração: quanto mais alta sua concentração, maior é a sua toxicidade (Hülsmann & Hahn, 2000; Ferraz *et al.* 2001, Gomes *et al.* 2003, Vianna *et al.* 2004).

O gluconato de clorexidina é efetivo contra um grande número de microrganismos Gram-negativos e Gram-positivos (especialmente contra

Enterococcus faecalis, que é conhecido por sua resistência ao tratamento endodôntico), leveduras, anaeróbios estritos e facultativos (Gomes *et al.* 2001, Vianna *et al.* 2004). Sua ação é resultado da sua adsorção à parede bacteriana, alterando sua estrutura e ocasionando um extravasamento de componentes intracelulares. É bacteriostático em baixa concentração, e bactericida em altas concentrações. Além disso, é absorvida pelos tecidos dentais e mucosas, resultando numa prolongada e gradual liberação (Ercan *et al.*, 2004; Hauman & Love, 2003; Öncag *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2001; Ferraz *et al.*, 2001).

A clorexidina tem sido usada como desinfetante não somente durante o preparo químico-mecânico, como também entre sessões (como medicação intracanal) para aumentar o índice de sucesso do tratamento endodôntico. Tem duas formas de apresentação: gel e líquida. Apesar das 2 formas terem atividade antimicrobiana similar (Gomes *et al.* 2001, Vianna *et al.* 2004), clorexidina gel, uma formulação viscosa, torna a instrumentação mais fácil, e aumentando a remoção mecânica dos tecidos orgânicos, compensa sua inabilidade em dissolverlos (Vivacqua-Gomes *et al.* 2003). Além disso, diminui a formação da smear layer, o que não acontece com a fórmula líquida (Ferraz *et al.* 2001). Pelo fato do gel ser solúvel em água, clorexidina e os debris são removidos fisicamente pela irrigação com a salina.

Em relação à capacidade de dissolução tecidual, a clorexidina fica em desvantagem em relação ao NaOCl, por não apresentar esta característica (Kuruvila & Kamath, 1998). Apesar de ser uma propriedade necessária à substância química auxiliar, a dissolução de tecido geralmente não é seletiva. O

extravasamento dessa substância através do forame apical pode causar danos aos tecidos periapicais (Spangberg *et al.*, 1973; Becking, 1991; Hülsmann & Hahn, 2000; Ferraz *et al.*, 2001).

Em altas concentrações o NaOCl é altamente tóxico (Späangberg *et al.*, 1973; Leonardo *et al.*, 1984) e tende a induzir irritações nos tecidos (Dakin, 1915). O aumento de sua concentração está diretamente relacionado como o aumento do seu poder antimicrobiano.

A clorexidina possui baixa toxicidade, não causa efeitos irritantes aos tecidos e possui efeito antimicrobiano residual, ou seja, possui uma liberação lenta e gradual por ser absorvida pelos tecidos dentinários (Dametto *et al.*, *in press*; Ferraz *et al.*, 2001; Tanomaru *et al.*, 2002). O efeito residual da clorexidina mantém a atividade antimicrobiana por um período de 48 h a 72 h depois do tratamento (Kuruvilla & Kamath 1998, Tanomaru *et al.*, 2002). Neste presente estudo, a substantividade da clorexidina não foi testada, sendo que o período máximo testado foi de 60 minutos.

Muitos trabalhos têm avaliado e comparado a eficácia do NaOCl e da clorexidina, tanto em trabalhos *in vivo* (Kuruvilla & Kamath, 1998, Leonardo *et al.*, 1999 e Ercan *et al.*, 2004), como em dentes extraídos (Jeansonne & White, 1994; Gomes *et al.*, 2003) e *in vitro* (Gomes *et al.*, 2001; Radcliffe *et al.*, 2004). Entretanto, a grande variedade de metodologia utilizada tem demonstrado uma grande discrepância nos resultados encontrados.

O presente estudo mostrou que os diferentes microrganismos foram suscetíveis, em vários graus, aos agentes testados e que a ação das substâncias

químicas está diretamente relacionada ao tempo de exposição, a ação ou não da agitação mecânica e forma de apresentação.

NaOCl 5,25% foi substância química mais efetiva, eliminando 100% dos microrganismos em todos tempos testados, com ou sem agitação, estando em concordância com resultados obtidos por Spratt *et al.*, (2001), utilizando a mesma metodologia. Também está de acordo com os trabalhos realizados por Gomes *et al.*, (2001), utilizando a metodologia de contato direto, onde o NaOCl 5,25% eliminou *E. faecalis* em tempos inferiores a 30 segundos, concordando também com Senia *et al.*, (1975). Vianna *et al.*, (2004) utilizando a metodologia de contato direto, demonstraram que o NaOCl 5,25% produziu culturas negativas após 15 segundos de contato com os microrganismos testados (*Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*).

Na concentração de 2,5%, o NaOCl necessitou de tempos superiores aos encontrados na concentração de 5,25%. Sob agitação mecânica foram necessários 5 minutos para ser obtida cultura negativa, e sem agitação mecânica, o NaOCl, permitiu o crescimento microbiano em todos os tempos testados.

Vianna *et al.*, (2004) demonstraram que o NaOCl 2,5% necessitou de 10 minutos para inibir 100% do crescimento microbiano de todas as espécies testadas. Radcliffe *et al.*, (2004) utilizaram várias concentrações do hipoclorito de sódio (0.5, 1.0, 2.5 e 5.25%) contra microrganismos endodônticos e demonstraram que o NaOCl 2.5% necessitou de 5 minutos para ser 100% eficaz. Comparando estes resultados com os obtidos em nosso trabalho, no grupo em que a agitação

mecânica não foi utilizada e o irrigante agiu por contato direto sobre o biofilme, houve divergência nos resultados obtidos, onde o NaOCl 2,5% permitiu o crescimento em todos os tempos testados.

Diferentes resultados foram encontrados em relação às formas de apresentação da clorexidina. Clorexidina líquida 2% obteve cultura negativa em 30 segundos contra todos os microrganismos testados sob agitação. Entretanto, necessitou de 5 minutos para ser totalmente efetiva sem a agitação mecânica. Clorexidina gel necessitou de 15 minutos para ser 100% eficaz sob agitação mecânica, e sem agitação necessitou de 60 minutos. Estes resultados vêm demonstrar a importância da estrutura do biofilme, onde sua matriz de exopolissacarídeo impede a difusão das substâncias químicas para o interior das colônias bacterianas, impedindo assim o contato direto das substâncias químicas auxiliares com os microrganismos.

Spratt *et al.*, (2001) utilizaram clorexidina na concentração de 0.2%, não especificando a forma que foi usada. Neste estudo, foram necessários 60 minutos para ser eficaz frente ao *E. faecalis* e *S. intermedius*, e 15 minutos frente ao *F. nucleatum*.

Todas as substâncias químicas testadas foram 100% efetivas contra os microrganismos anaeróbios estritos testados: *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* e *Fusobacterium nucleatum*, tanto com agitação como sem a mesma. Apesar de serem facilmente eliminados, estes microrganismos e suas associações são encontrados após procedimentos endodônticos (Gomes *et al.*, 1996a). Estas espécies apesar de

serem suscetíveis aos agentes antimicrobianos, podem sobreviver devido à associação com microrganismos mais resistentes (Spratt *et al.*, 2001). Nossos resultados estão de acordo com os de Vianna *et al.*, (2004), onde 30 segundos foi o tempo necessário para eliminar todos os microrganismos testados.

Fusobacterium nucleatum além de ser isolado freqüentemente de canais radiculares (Gomes *et al.*, 1996a; Molander *et al.*, 1998), desempenha importante papel na formação e maturação do biofilme (Kolenbrander, 2000). Neste trabalho, *F. nucleatum* não demonstrou nenhuma resistência frente às substâncias químicas testadas, sendo eliminado em 30 segundos. Poucos trabalhos utilizam este microrganismo, tornando-se difícil à comparação dos resultados encontrados. No estudo realizado por Spratt *et al.*, (2001), *F. nucleatum* foi eliminado em 15 minutos de contato com as soluções químicas auxiliares, estando em desacordo com os nossos resultados.

Candida albicans são microrganismos eucariotas que estão relacionados com a etiologia das doenças perirradiculares e com a persistência das lesões (Ferguson *et al.*, 2002; Siqueira & Sen, 2004; Radcliffe *et al.*, 2004). Este microrganismo possui vários mecanismos de virulência, tais como: poder de se adaptar a várias condições ambientais, adesão a várias superfícies, produção de enzimas hidrolíticas, transição morfológica, formação de biofilme e invasão e imunomodulação das células de defesa.

Neste trabalho, *C. albicans* necessitou de 30 minutos de contato com as soluções químicas auxiliares para ser totalmente eliminada sem a utilização da agitação mecânica; e de 15 minutos quando agitada em vórtex. Sob agitação

mecânica NaOCl 5,25, NaOCl 2,5%, clorexidina líquida e gel 2% necessitaram, respectivamente, de 30 segundos, 5 minutos, 30 segundos e 15 minutos para serem 100% eficazes frente a *C. albicans*. Sem agitação mecânica necessitaram, respectivamente, de: 30 segundos, 5 minutos, 5 minutos, e 30 minutos.

Em relação a suscetibilidade de *C. albicans* aos irrigantes testados, nossos resultados estão de acordo com os de Vianna *et al.*, (2004) em relação ao NaOCl 5,25% (15 segundos), com o NaOCl 2,5% (10 minutos) e a clorexidina líquida (15 segundos). Ferguson *et al.*, (2002) em seu trabalho buscaram determinar a efetividade das substâncias químicas e medicamentos em dentes bovinos, contaminados com *C. albicans*. Relataram que a concentração mínima inibitória (MIC) do NaOCl 5,25% e da clorexidina foram, respectivamente de <10µg/ ml e <0.63µg/ ml, sendo que ambas as soluções foram efetivas. No trabalho de Sen *et al.*, (1999), clorexidina necessitou de 60 minutos para eliminar a *C. albicans* da superfície dentinária, com ou sem a presença de smear layer.

Staphylococcus aureus é um dos patógenos mais versáteis, podendo se adaptar em muitos nichos, tanto no interior do corpo humano como na sua superfície. Sua virulência está associada com a produção de um grande número de toxinas extracelulares, enzimas e proteínas associadas à superfície celular (Kolenbrander *et al.*, 2000).

Neste trabalho *S. aureus*, sob agitação, necessitou de 10 minutos para ser 100% eliminado. Contudo, sem a utilização da agitação mecânica, necessitou de 60 minutos.

Em contato com o NaOCl 5,25% e clorexidina líquida 2%, sob agitação mecânica, *S. aureus* foi eliminado em 30 segundos e com o NaOCl 2,5% foi eliminado em 5 minutos. Resultado semelhante foi encontrado por Vianna *et al.*, (2004). Entretanto, com a clorexidina gel houve diferença nos resultados obtidos. No trabalho realizado por Vianna *et al.*, (2004), a clorexidina gel 2% necessitou de 15 segundos, enquanto que em nosso trabalho foram necessários 10 minutos. A diferença de resultados pode estar relacionada com a formação do biofilme e a presença de matriz de exopolissacarídeo.

Sem agitação mecânica, *S. aureus* necessitou 30 segundos para ser eliminado em contato com NaOCl 5,25 e 2,5% e clorexidina líquida 2%. Na presença da clorexidina gel 2%, *S. aureus* necessitou de 60 minutos.

Enterococcus são patógenos oportunistas relacionados com severas infecções em diferentes locais do corpo humano. *Enterococcus faecalis* é o microrganismo mais comumente encontrado em dentes com insucesso endodôntico, ganhando notoriedade como o microrganismo mais persistente, podendo sobreviver em monocultura no interior do canal radicular (Gomes *et al.*, 1996b e 2001; Love, 2001; Pinheiro *et al.*, 2004; Baldassarri *et al.*, 2004; Hufnagel *et al.*, 2004).

E. faecalis foi o microrganismo mais resistente frente a todos os irrigantes testados, necessitando de 60 minutos para ser completamente eliminado, concordando com o trabalho de Radcliffe *et al.*, (2004).

Sem agitação mecânica, *E. faecalis* se mostrou mais resistente frente ao hipoclorito de sódio 2,5% (60 minutos), seguido da clorexidina gel 2% (15

minutos). Diferentes resultados foram obtidos no trabalho de Vianna *et al* (2004), onde NaOCl 2,5% necessitou de tempo inferior para eliminar 100% de *E. faecalis*. Em relação a clorexidina, em ambas formas, necessitou de 15 s para obter cultura negativa.

O hipoclorito de sódio 5,25% e a clorexidina líquida não permitiram o crescimento do *E. faecalis*, com e sem agitação mecânica, em nenhum tempo testado, estando de acordo com resultado obtidos por Senia *et al.*, (1975), Gomes *et al.*, (2001) e Vianna *et al.*, (2004).

Diferentes resultados foram encontrados por Spratt *et al.*, (2001) em relação ao *Enterococcus faecalis*, onde NaOCl 2,5% foi 100% efetivo nos tempos testados (15 e 60 minutos) e a clorexidina 0.2% foi efetiva em apenas 60 minutos. A diferença pode estar relacionada com a concentração da clorexidina e com o tempo de formação do biofilme, que foi inferior neste trabalho (48 horas).

Sob agitação mecânica a clorexidina gel 2% necessitou de 5 minutos para ser 100% eficaz contra *E. faecalis*. Hipoclorito de sódio 2,5% não permitiu o crescimento em nenhum tempo testado.

Um dos principais mecanismos de resistência do biofilme está diretamente relacionado à falha dos agentes penetrarem em toda extensão do biofilme. Substâncias poliméricas, como aquelas que compõem a matriz do biofilme, retardam a difusão das substâncias químicas e antibióticos. Solutos, em geral, se difundem mais lentamente. A velocidade de penetração varia de acordo com o microrganismo formado e composição da matriz de exopolissacarídeo. Um segundo mecanismo de resistência está relacionado com a capacidade dos

microrganismos, presentes no interior do biofilme, ficarem por longos períodos de escassez de alimento, diminuindo sua taxa de crescimento. Microrganismo com baixa taxa de crescimento, ou nenhum crescimento não são muito suscetíveis às substâncias químicas (Costerton *et al.*, 1994 e 1999; Wimpenny *et al.*, 2000; Stoodley *et al.*, 2002).

Este trabalho demonstrou que todas as substâncias testadas podem ser utilizadas como substâncias químicas auxiliares durante o preparo químico-mecânico, devendo ser levado em consideração o tempo de contato das mesmas com o biofilme formado. Entretanto, deve-se levar em conta que microrganismos presentes no interior do sistema de canais radiculares dificilmente estão em sua forma planctônica, e sim na forma de biofilme e em regiões inacessíveis à instrumentação, tais como: interior de túbulos dentinários, canais acessórios e em istmos. Desta forma, trabalhos *in vitro* deveriam adotar esta metodologia para melhor refletir a realidade dos microrganismos endodôntico-patogênicos.

7. CONCLUSÃO

Com base no método experimental utilizado e nos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

Todas as substâncias testadas possuem ação antimicrobiana, sendo que o hipoclorito de sódio na concentração de 5,25% e a clorexidina líquida 2% foram as substâncias químicas auxiliares mais efetivas.

O biofilme formado por *Enterococcus faecalis* demonstrou maior resistência, não sendo eliminado pelo o hipoclorito de sódio 2,5%, sem agitação mecânica, durante os tempos testados.

A agitação mecânica realizada mostrou ser relevante, diminuindo o tempo de contato para a eliminação dos microrganismos presentes no biofilme.

A efetividade do agente antimicrobiano depende dos microrganismos que constituem o biofilme, do tempo de contato destes com o a substância química, da ação ou não da agitação mecânica e forma de apresentação da substância.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abou-Rass M, Piccinino MV. The effectiveness of four irrigation methods on the removal of root canal debris. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1982; 54: 323-8.
2. Almyroud A, Mackensie D, Mchugh S, Saunders WP. The effectiveness of various disinfectants used as endodontic intracanal medications: an in vitro study. *J Endod.* 2002; 2: 163-7.
3. Baldassarri L, Bertuccini L, Ammendolia MG, Cocconcelli P, Arciola CR, Montanaro L, Creti R, Orefici G. Receptor-mediated endocytosis of biofilm-forming *Enterococcus faecalis* by rat peritoneal macrophages. *Indian J Med Res.* 2004; 119: 131-135.
4. Baselg R, Albizu I, de la Cruz M, del Cacho E., Barberan M., Amorena B. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence. *Infect Immun.* 1993; 61: 4852-62.
5. Baumgartner IC, Cuenin PR. Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation. *J Endod.* 1992; 18: 605-12.
6. Becking AG. Complications in the use of sodium hypochlorite during endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991; 71: 346-8.
7. Black GV, Dr Black's conclusions reviewed again. *Dent.Cosmos,* 1898; 40: 440.

8. Bondestam O, Gahnberg L, Sund ML, Linder L. Effect of chlorhexidine gel treatment on the prevalence of Mutans streptococci and Lactobacilli in patients with impaired salivary secretion rate. *Spec Care Dentist*. 1996; 16: 123-7.
9. Busscher HJ, Bos R, van der Mei HC. Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. *FEMS Microbiol Lett*. 1995; 128(3): 229-34.
10. Byström A & Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res*. 1981; 89: 321-8.
11. Byström A & Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J*. 1985; 18: 35-60.
12. Byström A & Sundqvist G. Bacteriological evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg*. 1983; 55: 307-12.
13. Carlsson J. Bacterial metabolism in dental biofilms. *Adv Dent Res*. 1997; 11(1): 75-80.
14. Cawson RA, Curson I. The effectiveness of some antiseptics on the oral mucous membrane. *Br Dent J*. 1961; 111: 362-3.
15. Cervone F, Tronstad L, Hammond B. Antimicrobial effect of chlorhexidine in a controlled release delivery system. *Endod Dent Traumatol*. 1990; 6: 33-6.
16. Chen YS, Bungay HR. Micro-electrode studies of oxygen transfer in trickling filter slimes. *Biothechnology*, 1981; 23: 781-792.
17. Cheung GS, Stock CJ. *In vitro* cleaning ability of root canal irrigants with and without endosonics. *Int Endod J*. 1993; 26(6): 334-43.

18. Cimasoni G, Song M McBride BC. Effect of crevicular fluid and lysosomal enzymes on the adherence of streptotocci and bacteroides to hydroxyapatite. *Infect Immun.* 1987; 55:1484-89.
19. Correia FF, DiRienzo JM, Lamont RJ, Anderman C, McKay TL, Rosan B. Insertional inactivation of binding determinants of *Streptococcus crista* CC5A using Tn916. *Oral Microbiol Immunol.* 1995; 10(4): 220-6.
20. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie, TJ. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol.* 1987; 41: 435-464.
21. Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. *J Bacterio.* 1994; 176: 2137-2142.
22. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science.* 1999; 284: 1318-1322.
23. Dahlén G, Samuelsson W, Moander A, Reit C. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. *Oral Microbiol Immunol.* 2000; 15: 775-12.
24. Dakin, HD. On the use of certain substances in the treatment of infected wounds. *British Med. J.* 1915; 2: 318-320.
25. D'Arcangelo C, Varvara G, De Fazio P. An evaluation of the action of different root canal irrigants on facultative aerobic-anaerobic, obligate anaerobic, and microaerophilic bacteria. *J Endod.* 1999 ;25(5): 351-3.

26. Dametto FR, Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-filho FJ. *In vitro* assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* (In press).
27. Davies DG, Chakrabarty, AM., Geesey, G. G., Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*. 1993; 59: 1181-1186.
28. de Beer D, van de Heuvel JC, Ottengraf SP. Micro-electrode measurements of the activity distribution in nitrifying bacterial aggregates. *Appl Environ Microbiol*. 1993; 59: 573-579.
29. Dewanti R, Wong AC. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol*. 1995; 26(2): 147-64.
30. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod*. 2002; 28:689-693.
31. Egan MW, Spratt DA, Ng YL, Lam JM, Moles DR, Gulabivala K. Prevalence of yeasts in saliva and root canals of teeth associated with apical periodontitis. *Int Endod J*. 2002; 35(4): 321-9.
32. El-Azizi MA, Starks SE, Khardori N. Interactions of *Candida albicans* with other *Candida* spp. and bacteria in the biofilms. *J Appl Microbio*. 2004; 96: 1067-1073.
33. Ercan E, Ozekinci T, Atakul F, Gül K. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: In vivo study. *J Endod*. 2004; 30: 84-87.

34. Estrela C, Estrela CRA, Moura J, Bammann LL. Testing calcium hydroxide antimicrobial potential by different methods. *J Dent Res*, 2000; 79: 529 (IADR abstract 3081).
35. Estrela C. Metodologia científica. 1ª ed. Artes médicas, São Paulo, 2001.
36. Fardal O, Turnbull R.S. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *JADA*. 1986; 112: 863-9.
37. Ferguson, JW, Hatton, JF, Gillespie, MJ. Effectiveness of intracanal irrigants and medications against the yeast *Candida albicans*. *J Endod*. 2002; 28: 68-71.
38. Ferllini filho J. Estudo radiográfico e microscópico das reabsorções radiculares na presença de lesões periapicais crônicas (microscopia ótica e MEV). Bauru, 1999. 186 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
39. Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* assessment of the antimicrobial action and mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod*. 2001; 7: 452-5.
40. Feuline F, Erbersole JL, Kesavalu L, Stepfen MJ, Holt SC. Mixed infection with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* in a murine lesion model: potencial synergistic effects on virulence. *Infect. Immun*. 1996; 64: 2095-100.
41. Fidel SR, Marques JLL, Antoniazzi JH. Avaliação da capacidade de penetração dentinária radicular da clorexidina associada a três diferentes veículos. *Rev Paul G*. 1995; 2: 121-6.

42. Foley DB, Weine FS, Hagen JC, deObarrio JJ. Effectiveness of selected irrigants in the elimination of *Bacterioides melaninogenicus* from the root canal system: an *in vitro* study. *J Endod*. 1983; 9: 236-41.
43. Ganeshkumar N, Hannam PM, Kolenbrander PE, McBride BC. Nucleotide sequence of a gene coding for a saliva-binding protein (SsaB) from *Streptococcus sanguis* 12 and possible role of the protein in coaggregation with actinomyces. *Infect Immun*. 1991; 59(3): 1093-9.
44. Gillece-Castro BL, Prakobphol A, Burlingame AL, Leffer H, Fisher SJ. Structure and bacterial receptor activity of a human salivary proline-rich glycoprotein. *J Biol Chemical*. 1991; 266: 358-68.
45. Goldman M, Pearson AH. Postdebridement bacterial flora and antibiotic sensitivity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1969; 28(6): 897-905.
46. Gomes BPFA, Drucker DB, Liley JD. Association of specific bacteria with some endodontic sings and symptoms. *Int Endod J*, 1994a; 27: 291-298.
47. Gomes BPFA, Drucker DB, Liley JD. Negative and positive associations between bacterial species in root canals. *Microbios*. 1994b; 80:231-243.
48. Gomes BPFA. An investigation into the root canal microflora. PhD thesis. University of Manchester, UK.
49. Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB. Recovery of porphyromonas endodontalis and porphyrononas gengivalis by two different sampling techniques. *J Dent Res*. 1995; 74:848.

50. Gomes BPFA, Drucker DB, Liley JD. Association of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. *Int Endod J.* 1996a;29:69-75.
51. Gomes BPFA, Liley JD, Drucker DB. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *Int Endod J.* 1996b; 29: 235-241.
52. Gomes BPFA, Ferraz CCR, Vianna ME, Berber VB., Teixeira FB, Souza-filho FJ. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 2001; 34: 424-8.
53. Gomes BPFA. Microrganismos: quais são, onde estão e que danos causa?. In: CARDOSO, Rielson José Alves; GONCALVES, Elenice Aparecida Nogueira.(Org). *Endodontia & Trauma*. 1^a.ed. 2002,v. 2, p.77-97.
54. Gomes BPFA, Sato CC, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-filho FJ. Evaluation of time required for recontamination of coronally sealed canals medicated with calcium hydroxide and chlorhexidine. *Int Endod J.* 2003;36, 604-9..
55. Gomes BPFA, Pedroso J, Jacinto RC, Vianna ME, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of five root canal sealers. *Br Dent J.* 2004; 15(1): 30-35.
56. Greenstein G, Bermant C, Jaffin R. Chlorhexidine an adjunct to periodontal therapy. *J Periodon.* 1986; 00: 370-8.

57. Gutierrez JH, Brizuela C, Villota E. Human teeth with periapical pathosis after overinstrumentation overfilling of root canals: a scanning electron microscopic study. *Int Endod J.* 32, 40-8. 1999.
58. Haapasalo M, Ranta H, Ranta K, Shah H. Black-pigmented *Bacteroides* spp. In human apical periodontitis. *Infect Immuno.* 1986; 53:149-53.
59. Hagihara Y, Kaminishi H, Cho T, Tanaka M, Kaita H. Degradation of human dentine collagen by an enzyme produced by the yeast *Candida albicans*. *Arch Oral Biol.* 1988; 33: 617-9.
60. Hauman CHJ & Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *Int Endod J.* 2003; 36; 75-85.
61. Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbio.* 2000; 146: 2395-407.
62. Heling B, Shapira J. Roentgenologic and clinical evaluation of endodontically treated teeth, with or without negative culture. *Quintessence Int.* 1978; 9(11): 79-84
63. Hufnagel M, Koch S, Creti R, Baldassarri L., Huebner J. A putative Sugar-binding transcriptional regulator in a novel gene locus in *Enterococcus faecalis* contributes to production of biofilm and prolonged bacteremia in mice. *The J Infect Dis.* 2004; 189: 420-430.
64. Hulsman M, Hahn W. Complications during root canal irrigation--literature review and case reports. *Int Endod J.* 2000; 33(3): 186-93.

65. Ingle JE, Zeldow BJ. An evaluation of mechanical instrumentation and negative culture in endodontic therapy. *J Amer Dent Assoc.* 1958; 57:471.
66. Jansen HJ, Van der Hoeven JS. Protein degradation by *Prevotella intermedia* and *actinomyces meyeri* supports the growth of non-protein-cleaving oral bacteria in serum. *J Clin Periodon.* 1997; 24: 346-53.
67. Järvensivu A, Hietanen J, Rautemma R, Sorsa T, Richardson M. *Candida* yeast in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms *in vivo*. *Periodon Oral Microbio.* 2004; 10: 106-112.
68. Jeansone MJ, White RR. A comparison of 2% chlorhexidine and 5,25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod.* 1994, 20: 276- 8.
69. Jung IY, Choi BK, Kum KY, Lee SJ, Lee CY, Park DS. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection. *J Endod.* 2000; 26: 599-604.
70. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg.* 1965; 20: 340-9.
71. Kamaguchi A, Nakayama K., Ohyama T, Watanabe T, Okamoto M, Baba H. Coaggregation of *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*. *Microbio Immuno.* 2001; 44: 649-656.
72. Kaufman AY, Keila S. Hypersensitivity to sodium hypochlorite. *J Endod* 1989; 15:224-6.
73. Kimberly JK. What drives bacteria to produce biofilm? *FEMS microbio letters.* 2004; 236: 163-173.

74. Kolenbrander PE. Oral microbial communities: Biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbio*. 2000; 54: 413-437.
75. Kolenbrander PE, Andersen RN. Characterization of *Streptococcus gordonii* (S. sanguis) PK488 adhesin-mediated coaggregation with *Actinomyces naeslundii* PK606. *Infect Immun*. 1990; 58(9): 3064-72.
76. Kolenbrander PE, Andersen RN, Moore LV. Intrageneric coaggregation among strains of human oral bacteria: potential role in primary colonization of the tooth surface. *Appl Environ Microbiol*. 1990; 56(12): 3890-4.
77. Kolenbrander PE. Intergeneric coaggregation among human oral bacteria and ecology of dental plaque. *Annu Rev Microbio*. 1988; 42: 627-56.
78. Korber DR, Lawrence JR, Lappin-Scott HM, Costerton JW. Growth of microorganisms on surfaces. IN Microbial Biofilms, ed. HM Lappin-Scott, J.W Costerton .Cambridge,UK: Cambridge University Press.1995;15-45.
79. Kuruvilla JR, Kamath MP. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. *J Endod*. 1998; 24(7): 472-6.
80. Lamfon H, Porter SR, McCullough M, Pratten J. Formation of *Candida albicans* biofilms on non-shedding oral surfaces. *Euro J Oral Sciense*. 2003; 111: 465-471.
81. Lamothe LCJ, Frenette M. Coaggregation of *Streptococcus salivarius* with peiodontopathogens:evidence for involvement of fimbriae in the interaction with *Prevotella intermedia*. *Oral Microbio Immuno*. 2003;18: 333-7.

82. Lawrence JR, Korber DR, Caldwell DE. Behavioral analyses of *Vibrio parahaemolyticus* variants in high- and low-viscosity microenvironments by use of digital image processing. *J Bacterio*. 1992; 174: 5732- 5739.
83. Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LA, Nelson Filho P, Bonifacio KC, Ito IY. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *J Endod*. 1999; 25(3): 167-71.
84. Leonardo MR, Lia RCC, Esberard RM, Benatti Neto C. Immediate root canal filling: the use of cytophylactic substances and noncytotoxic solutions. *J Endod*. 1984; 10: 1-8.
85. Leonardo MR, da Silva LA, Filho MT, Bonifacio KC, Ito IY. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a castor oil-based irrigant. *J Endod*. 2001; 27(12): 717-9.
86. Lin LL, Skrbner JE, Gaengler P. Factors associated with endodontic treatment failures. *J Endod*. 1992; 18: 625-627.
87. Lopes HP & Siqueira JR JF. Endodontia-biologia e técnica. 1ª ed. MEDSI, 1999.
88. Love RM. *Enterococcus faecalis*- a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J*. 2001; 34: 399-405.
89. Love RM, McMillan MD, Park Y, Jenkinson HF. Coinvasion of dentinal tubules by *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus gordonii* depends upon binding specificity of streptococcal antigen I/II adhesin. *Infect Immun*. 2000; 68(3): 1359-65.

90. MacLeod FA, Guiot SR, Costerton JW. Layered structure of bacterial aggregates produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor. *Appl Environ. Microbio.* 1990; 56: 1598-1607.
91. Marsh P & Martin M. Oral microbiology. 1992; 3rd edn, London, UK: Chapman and Hall.
92. Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbio.* 1995; 15(3): 169-75.
93. Mayrand D, McBride BC. Ecological relationships of bacteria involved in a simple, mixed anaerobic infection. *Infect Immun*, 1980; 27: 44-50.
94. Mayrand D, Holt SC. Biology of asaccharolytic black-pigmented bacterioides species. *Microbio Rev.* 1988; 52(1): 134-52.
95. Miller WD. The microorganisms of the human mouth, S.S. White Dental Mfg. Co. Philadelphia, PA, 1840.
96. Miller WD. An introduction to the study of the bacterio-pathology of the dental pulp. *Dental Cosmos*, 1894; 36: 505-28.
97. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1998; 31:1-7.
98. Möller AJR, Fabricus L, Dahlén G, Öhman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res*, 1981; 89:475-84.
99. Morse DR. Microbiology and Pharmacology. In: Cohen S & Burns RC, eds. *Pathways of the pulp*. 4th edn. St. Louis, MO, USA: CV Mosby Co.

100. Myers AR, Miller LM, Pinals RS. Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. *Lancet*. 1969; 2: 714-6.
101. Nair PNR, Sjögreen U, Key G, Kahnberg K-E, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, a symptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a lonterm light and electron microscopic follow-up study. *J Endod*. 1990; 16; 580-8.
102. Najzar-Fleger D, Filipovic D, Prpic G, Kobler D. *Candida* in root canal in accordance with oral ecology. *Int Endod J*. 1992; 25; 40.
103. Neal RG, Craig RG, Powers JM. Effect of sterilization and irrigants on the cutting abilities of stainless steel files. *J Endod* 1983; 9:93-6.
104. Nesbitt WE, Fukushima H, Leung KP, Clark WB. *Infection and Immunity*. 1993; 2011-2014.
105. Nyvad B, Ferjerskov O. Assessing the stage of caries lesion activity on the basis of clinical and microbiological examination. *Commun. Dental oral epidemiol*. 1997; 25:69-75.
106. Ohara PK, Torabinejad M, Kettering JD. Antibacterial effects of various endodontic irrigants on selected anaerobe bacteria. *Endod Dent Traumatol*. 1993; 9: 95-100.
107. Oligino L, Fives-Taylor P. Overexpression and purification of a fimbria-associated adhesin of *Streptococcus parasanguis*. *Infect Immun*. 1993; 61(3): 1016-22.

108. Önçag Ö, Hosgör M, Hilmioglu S, Zekioglu O, Eronat C, Burhanoglu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. *Int Endod J*. 2003; 36: 423-432.
109. O'toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbio*. 1988; 30: 295-304.
110. O'toole GA, Kaplan HB, Kolter R. Biofim formation as microbial development. *Annu Rev Microbio*. 2000; 54:49-79.
111. Percor JD, Souza neto MD, Estrela C. Soluções auxiliares ao preparo do canal radicular. In: ESTRELA C, FIGUEIREDO JAP. Endodontia: princípios biológicos e mecânicos. São Paulo: Artes Médicas, 1999; 553-69.
112. Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J*. 200; 34(6): 429-34.
113. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J*. 2003; 36. 1-11.
114. Pontes ACF. Obtenção dos níveis de significância para os testes de Krukal-Wallis, Friedman e comparações múltiplas não-paramétricas. Dissertação de Mestrado, Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo 9ESALQ/USP; 2000.140

115. Pontes ACF, Corrente JE. Obtenção de níveis de significância para experimentos em blocos casulizados e comparações múltiplas não-paramétricas. *Rev de La Sociedade Argen de Estad.* 2000; 4:51-78.
116. Portera C. Forging a link between biofilms and disease. *Science.* 1999; 283: 1837-9.
117. Pratten J, Wilson M, Spratt DA. Characterization of in vitro oral acterial biofilms by traditional and molecular methods. *Oral Microbio Immuno.* 2003; 18(1): 45-9.
118. Pratt LA, Kolter R. Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol.* 1998; 30: 285-93.
119. Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, Habahbeh N, Qualtrough A, Worthington H, Drucker DB. Antimicrobial activity of vaying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms actinomyces israelii, a naeslundii, candida albicans and enterococcus faecalis. *Int Endod J.* 37, 438-46, 2004.
120. Rams TE, Feik D, Young V, Hammond BF, Slots J. Enterocci in human periodontitis. *Oral Microbio Immuno.* 1992; 7: 249-52.
121. Rickard AH, Leach SA, Hall LS, Buswell CM, High NJ, Handley PS. Phylogenetic relationships and coaggregation ability of freshwater biofilm bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68: 3644-50.
122. Rosa Neto JJ, Estudo MEV do ápice radicular e do limite de obturação em dentes portadores de lesão periapical crônica. Araraquara, 1997. 156 p. Tese

(Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista.

123. Rosan B, Lamont, RJ. Dental plaque formation. *Microbes and Infect.* 2000; 1599-1607.
124. Sen BH, Safavi KE, Spangberg LSW. Growth patterns of candida albicans in relation to radicular dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1997; 84: 68-73.
125. Sen BH, Safavi KE, Spangberg LSW. Antifungal effects of sodium hypochlorite solution as root canal irrigants. *J Endod.* 1999; 25: 235-8.
126. Senia ES, Marraro RV, Mitchell JL, Lewis AG, Thomas L. Rapid sterilization of gutta-percha cones with 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod.* 1975; 1: 136-40.
127. Shah HN, Collins DM. Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a new genus, *Porphyromonas*. *Int J Bacterio.* 1988; 33: 128-31.
128. Shah HN, Collins DM. Prevotella, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. *Int J Syst Bacterio.* 1990; 40: 205-8.
129. Shih M, Marshall FJ, Rosen SR. The bactericidal efficiency of sodium hypochlorite as an endodontic irrigant. *Oral Surg. Oral Med. Oral. Pathol.* 1963; 16:1474-90.
130. Siqueira Jr JF, Uzeda M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. *J Endod*, 1997; 23: 167-9.

131. Siqueira jr JF, Batista MMD, Fraga RC, Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black pigmented gram-negative anaerobes and facultative bactéria. *J Endod.* 1998; 24: 414-6.
132. Siqueira Jr JF, de Uzeda M. Influence of different vehicles on the antibacterial effects of calcium hydroxide. *J Endod.* 1998; 24: 663-5.
133. Siqueira jr JF, Lima KC, Magalhães FA, Lopes HP, Uzeda M. Mechanical reduction of the bacterial population in the root canal by three instrumentation techniques. *J Endod.* 1999; 25: 332-5.
134. Siqueira Jr JF. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J.* 2001; 34: 1-10.
135. Siqueira Jr JF. Endodontic infections: Concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 2002; 94: 281-293.
136. Siqueira JF, Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2004; 632-641.
137. Siqueira Jr JF. Tratamento das infecções endodônticas. Medsi. 1st ed. Rio de Janeiro, RJ.
138. Sjogren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1997 Sep; 30: 297-306.
139. Spangberg L, Engström B, Langeland K. Biologic effects of dental materials 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1973; 36: 856-70.

140. Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K. An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *Int Endod J*, 2001; 34:300-307.
141. Siren EK, Haapasalo MPP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo ENJ. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J*. 1997; 30: 91-95.
142. Stinson MW, Haraszthy GG, Zhang SL, Levine MJ. Inhibition of *Porphyromonas gingivalis* adhesion to *Streptococcus gordonii* by human submandibular-sublingual saliva. *Infect. Immunol.* 1992; 60: 2598-2604.
143. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton J.W. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Rev Microbio.* 2002; 56: 187-209.
144. Stoodley P, Lewandowski Z, Boyle JD, Lappin-Scott HM. The formation of migratory ripples in a mixed species bacterial biofilm growing in turbulent flow. *Environ Microbio.* 1999; 1: 447-55.
145. Sundqvist G. Prevalence of Black-pigmented Bacterioides species in root canal infections. *J Endod*, 1989; 15:13-9.
146. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J endod.* 1992; 18:427-30.
147. Sundqvist G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg*, 1994; 78: 522-30.
148. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1998; 85, 86-93.

149. Vivacqua-Gomes N, Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Influence of irrigants on the coronal microleakage of laterally condensed gutta-percha root fillings. *Int Endod J.* 2002; 35:791-5.
150. Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Silva LAB, Anibal FF, Faccioli LH. Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions. *Int Endod J.* 2002; 35: 735-9.
151. Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, *et al.* The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67: 4538- 45.
152. Tolker-Nielson T, Brinch UC, Ragas PC, Andersen JB, Jacobseeb CS, Molin S. Development and dynamics of *Pseudomonas sp.* Biofilm. *Jf Bacterio.* 2000; 181:6482-89.
153. Tronstad L, Barnett F, Cervone F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. *Endod Dent Traumato,* 1990; 6: 73-7.
154. Vianna ME, Gomes BPFA, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 97: 79-84.
155. Waltimo TMT, Sirén EK, Orstavik D, Haapasalo MPP. Susceptibility of oral *Candida* species to calcium hydroxide *in vitro*. *Int Endod J.* 1999; 32:94-8.
156. Waltimo TMT, Sirén EK, Torkko HLK, Olsen I, Haapasalo MPP. Fungi in therapy-resistant apical periodontics. *Int Endod J.* 1997; 30:96-101.

157. Walton RE. Concepts of canal preparation. *Dent Clin North Am* 1992; 36:309-26.
158. Weine FS, Wax AH, Wenckus CS. Retrospective study of tapered, smooth post systems in place for 10 years or more. *J Endod*. 1991; 17: 293-7.
159. Wilson, M. Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. *J Med Microbio*. 1996; 44:79-87.
160. Wimpenny J, Manz W, Szewzyk U. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbio Rev*. 2000; 24: 661-671.
161. White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endod*: 1997; 229-31.
162. Whittaker, CJ, Klier CM, Kolenbrander, PE, *Ann Rev. Microbio*. 1996; 50:513.
163. Whittaker CJ, Clemans DL, Kolenbrander PE. Insertional inactivation of an intragenomic coaggregation-relevant adhesin locus from *Streptococcus gordonii* DL1 (Challis). *Infect Immun*. 1996; 64: 4137-42.

Anexo

1. Microscopia eletrônica de Varredura

Paralelamente a este estudo, as amostras foram submetidas à microscopia eletrônica de varredura para verificar a manutenção da estrutura do biofilme após contato com as diferentes substâncias químicas auxiliares. Foram avaliadas as membranas que foram submetidas ao contato com as soluções químicas auxiliares: NaOCl 5,25%, NaOCl 2,5% e clorexidina gel 2,0%.

1.2. *Processamento para Microscopia Eletrônica de Varredura*

As membranas foram desidratadas em banhos de álcool crescente a 50, 70, 80, 90% por 15 minutos em cada troca, e álcool absoluto por 1 hora. Após a desidratação os espécimes ficaram por 12 horas em estufa 37°C. Em seguida, os espécimes foram cobertos com ouro puro, até obter espessura de 200µm, em metalizador EMITECH K650 SPITTER COATER. Após metalização, as membranas foram observadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) DSM 940 A (Figura 9).

1.3. *Análise das amostras*

Inicialmente foi utilizado um aumento de 50 vezes para localização da área que o biofilme estivesse presente. Aumentos maiores de até 10.000 vezes foram utilizados para verificar a presença do biofilme, observando os microrganismos, a

estrutura do biofilme após o contato com o irrigante. Os resultados foram colocados em tabelas.

A microscopia tem sido utilizada para detectar a presença de microrganismo no sistema de canais radiculares e região perirradicular, a forma dos microrganismos, assim como formação de biofilme e as diferentes associações microbianas (Wimpenny *et al.*, 2000).

A utilização do microscópio eletrônico de varredura (MEV) neste estudo teve como intuito demonstrar a presença ou ausência da estrutura do biofilme na membrana de nitrato de celulose após o tempo de contato com os irrigantes testados, com ou sem a utilização da agitação mecânica. Nossos resultados demonstraram que o NaOCl (2,5 e 5,25 %) apresentaram grande poder de dissolução tecidual, desestruturando a estrutura do biofilme por completo, tanto com e sem agitação mecânica. Na concentração mais elevada (5,25%) o NaOCl além de desestruturar o biofilme, também danificou a estrutura da membrana de nitrato de celulose, chegando a reabsorver completamente a membrana.

A clorexidina gel 2% manteve a estrutura do biofilme em todos os tempos testados, com e sem agitação. Com o uso do recurso da agitação, tentando simular a instrumentação mecânica e o fluxo e refluxo das substâncias químicas auxiliares, houve áreas em que ocorreu a desestruturação e remoção do biofilme. Entretanto, na maioria das amostras, mesmo com resultados microbiológicos negativos, grande parte da estrutura foi mantida intacta.

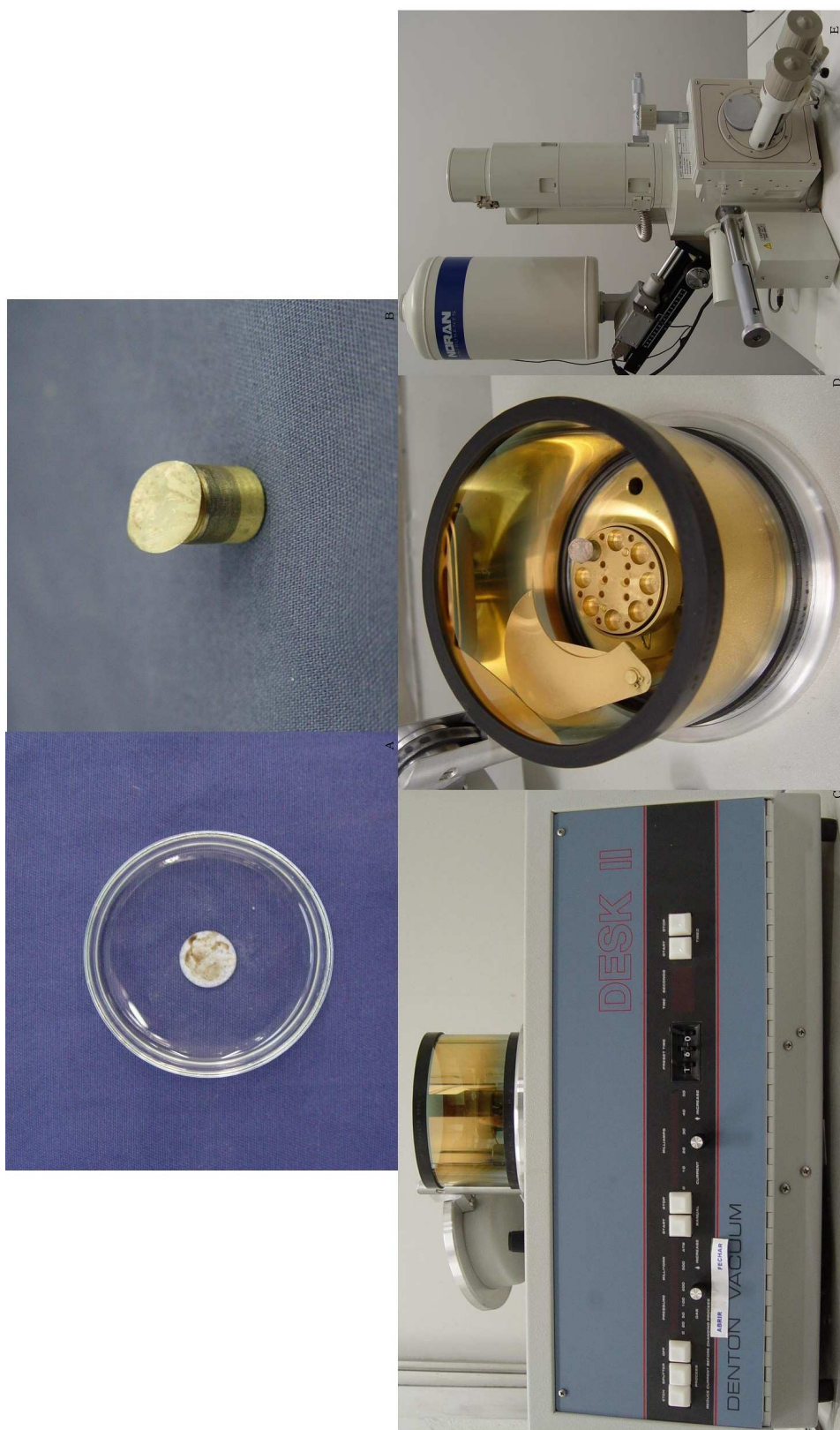


Fig. 9: A: Banho de álcool ascendente: 25%, 50%, 75%, 90% por 20 minutos e 100% por 1 hora; B: Colocação da membrana sobre o "stub"; C, D : Jateamento de ouro; E: Leitura no microscópio eletrônico de varredura.

Tabela 33. Manutenção da estrutura do biofilme de *P. intermedia* após contato com substâncias químicas auxiliares -com agitação.

tempo	CLX Gel 2%	NaOCl 2,5%	NaOCl 5,25%
30s	+	-	-
5 min	+	-	-
10 min	+	-	-
15 min	+	-	-
30 min	+	-	-
60 min	+	-	-

Tabela 34. Manutenção da estrutura do biofilme de *P. intermedia* após contato com as substâncias químicas auxiliares testadas – sem agitação.

tempo	CLX Gel 2%	NaOCl 2,5%	NaOCl 5,25%
30s	+	-	-
5 min	+	-	-
10 min	+	-	-
15 min	+	-	-
30 min	+	-	-
60 min	+	-	-

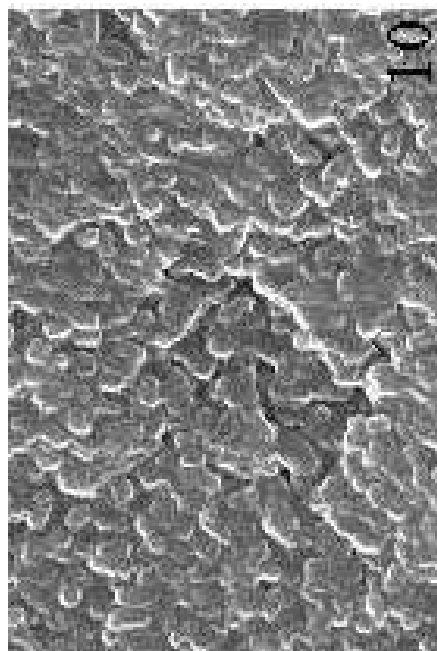


Figura 10. Biofilme *P. intermedia*

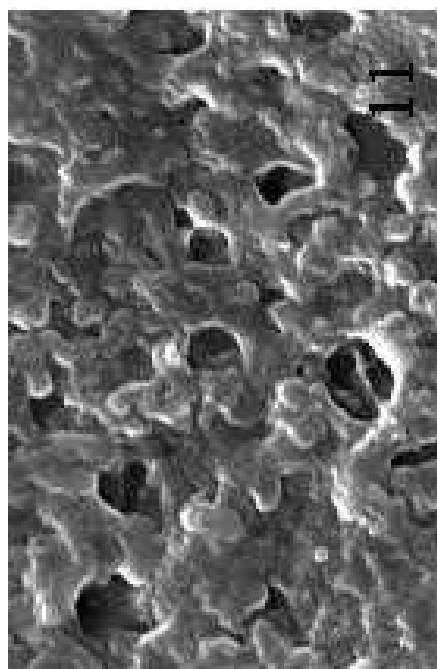


Figura 11. Biofilme *P. intermedia*

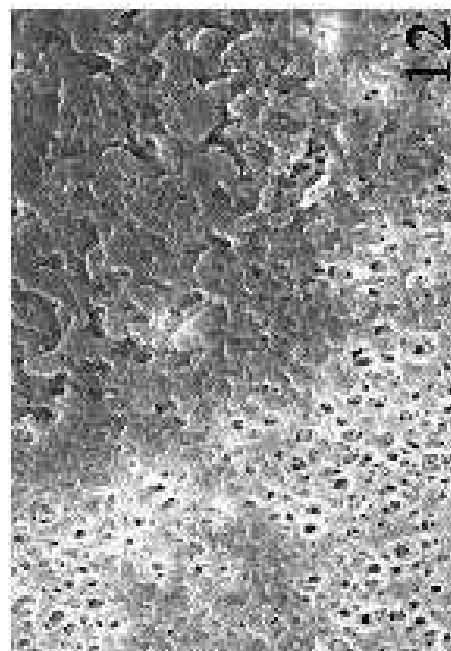


Figura 12. Biofilme *P. intermedia* com cloroxidina gel 2%-com agitação

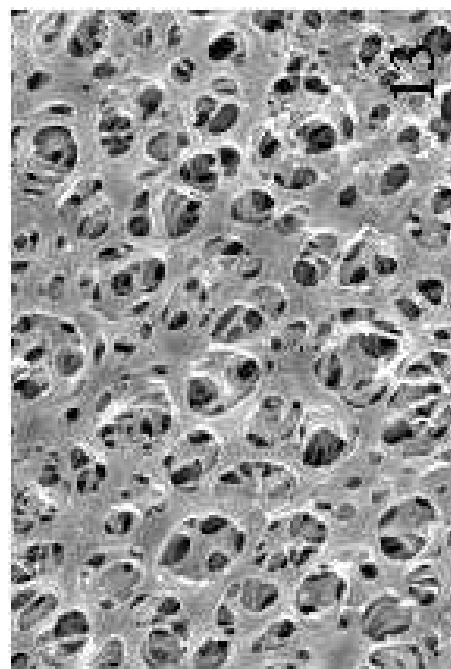


Figura 13. Biofilme *P. intermedia* com NaOCl 2,5%- com agitação

Tabela 35. Manutenção da estrutura do biofilme de *P. endodontalis* após contato com as substâncias químicas auxiliares testadas -com agitação.

tempo	CLX	Gel 2%	NaOCl 2,5%	NaOCl 5,25%
30s		+	-	-
5 min		+	-	-
10 min		+	-	-
15 min		+	-	-
30 min		+	-	-
60 min		+	-	-

Tabela 36. Manutenção da estrutura do biofilme de *P. endodontalis* após contato com as substâncias químicas auxiliares testadas -sem agitação.

tempo	CLX	Gel 2%	NaOCl 2,5%	NaOCl 5,25%
30s		+	-	-
5 min		+	-	-
10 min		+	-	-
15 min		+	-	-
30 min		+	-	-
60 min		+	-	-

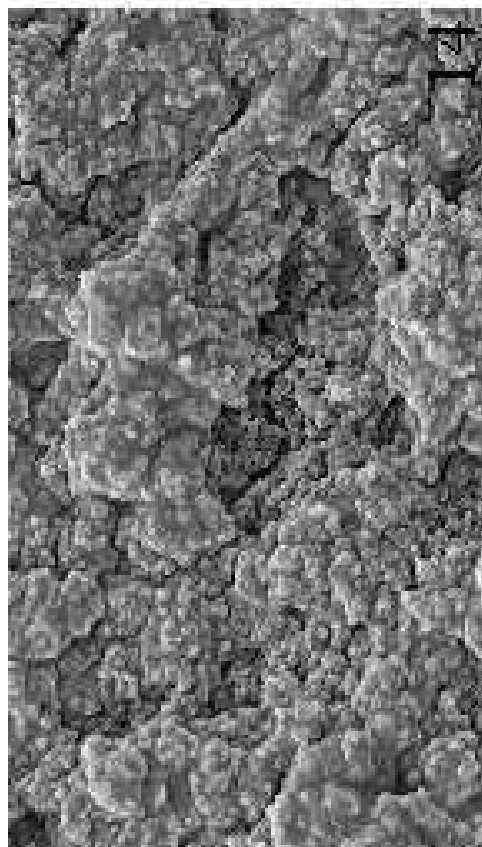


Figura 14. Biofilme *P. endodontalis*

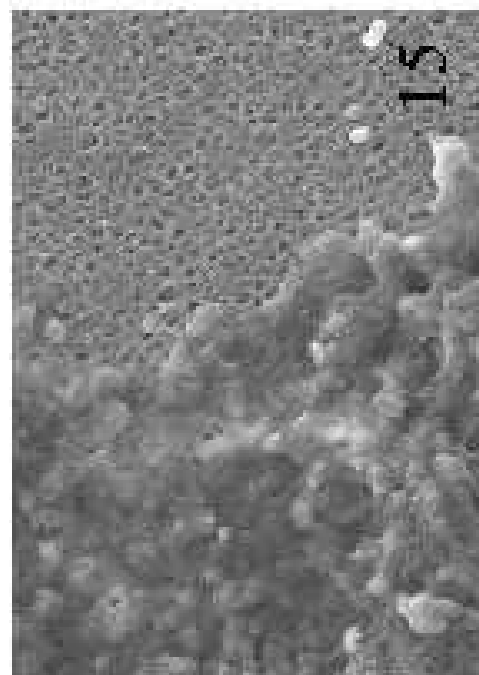


Figura 15. Biofilme *P. endodontalis* com clorhexidina gel 2% com agitação

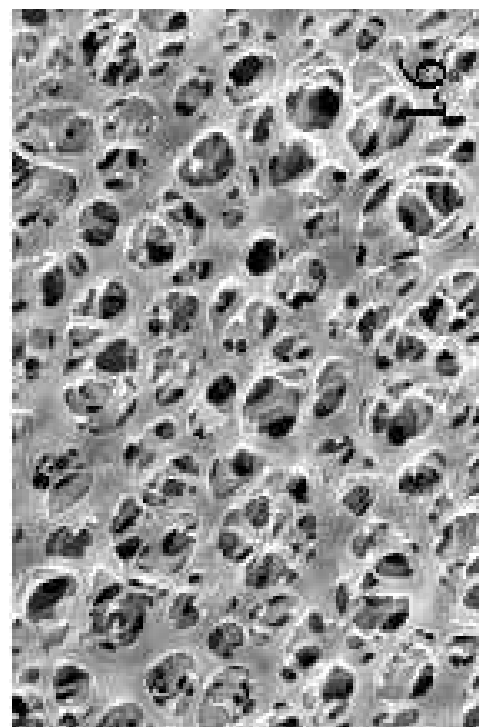


Figura 16. Biofilme *P. endodontalis* com NaOCl 2,5% com agitação

Tabela 37. Manutenção da estrutura do biofilme de *P. gingivalis* após contato com as substâncias químicas auxiliares testadas - com agitação.

tempo	CLX	Gel 2%	NaOCl 2,5%	NaOCl 5,25%
30s		+	-	-
5 min		+	-	-
10 min		+	-	-
15 min		+	-	-
30 min		+	-	-
60 min		+	-	-

Tabela 38. Manutenção da estrutura do biofilme de *P. gingivalis* após contato com as substâncias químicas auxiliares testadas - sem agitação.

tempo	CLX	Gel 2%	NaOCl 2,5%	NaOCl 5,25%
30s		+	-	-
5 min		+	-	-
10 min		+	-	-
15 min		+	-	-
30 min		+	-	-
60 min		+	-	-

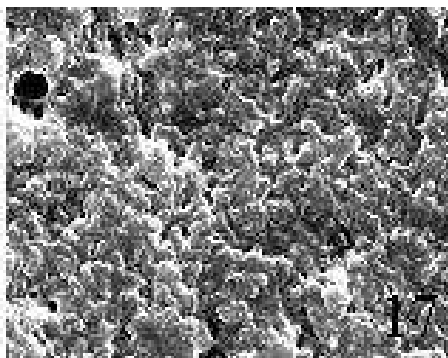


Figura 17. Biofilme *P. gingivalis*

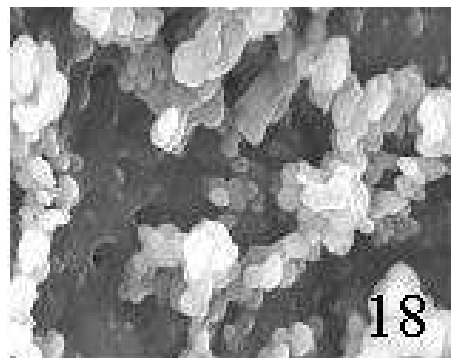


Figura 18. Biofilme *P. gingivalis*

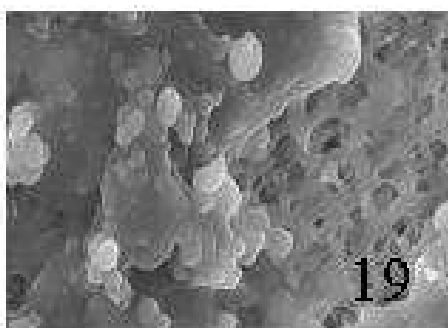


Figura 19. Biofilme *P. gingivalis* com clorhexidina gel 2%- com agitação

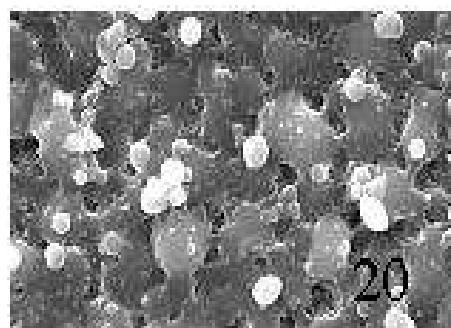


Figura 20. Biofilme *P. gingivalis* com clorhexidina gel 2%- sem agitação

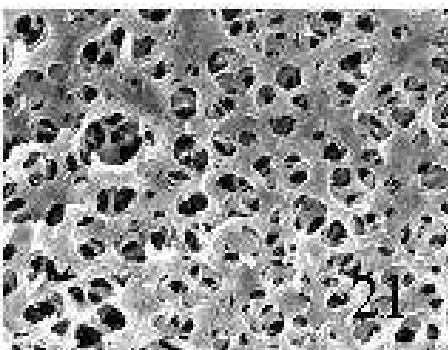


Figura 21. Biofilme *P. gingivalis* com NaOCl 2,5%- com agitação

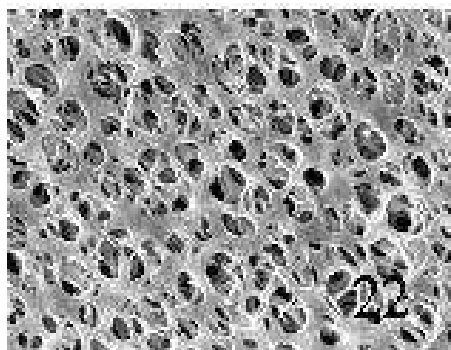


Figura 22. Biofilme *P. gingivalis* com NaOCl 2,5%- sem agitação

Tabela 39. Manutenção da estrutura do biofilme de *F. nucleatum* após contato com as substâncias químicas auxiliares testadas - com agitação.

tempo	CLX	Gel 2%	NaOCl 2,5%	NaOCl 5,25%
30s		+	-	-
5 min		+	-	-
10 min		+	-	-
15 min		+	-	-
30 min		+	-	-
60 min		+	-	-

Tabela 40 . Manutenção da estrutura do biofilme de *F. nucleatum* após contato com as substâncias químicas auxiliares testadas - sem agitação.

tempo	C CLX	Gel 2%	NaOCl 2,5%	NaOCl 5,25%
30s		+	-	-
5 min		+	-	-
10 min		+	-	-
15 min		+	-	-
30 min		+	-	-
60 min		+	-	-

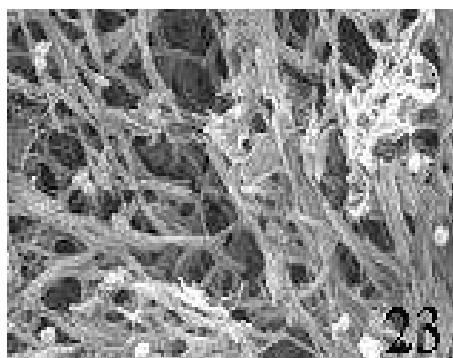


Figura 23. Biofilme *F. nucleatum*

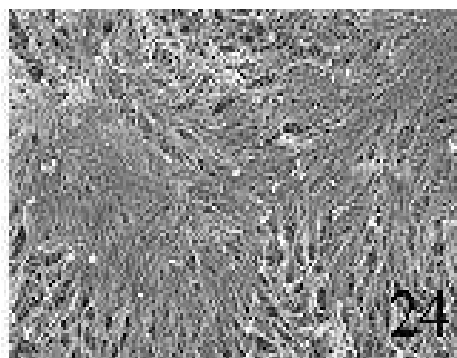


Figura 24. Biofilme *F. nucleatum*

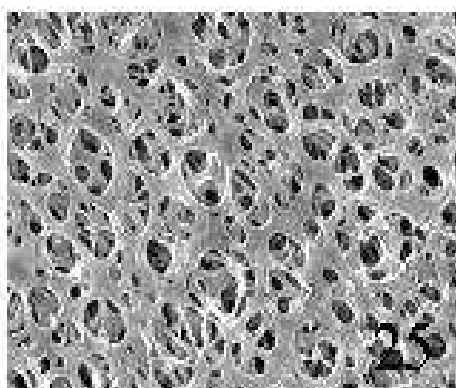


Figura 25. Biofilme *F. nucleatum* com NaOCl 2,5%-sem agitação

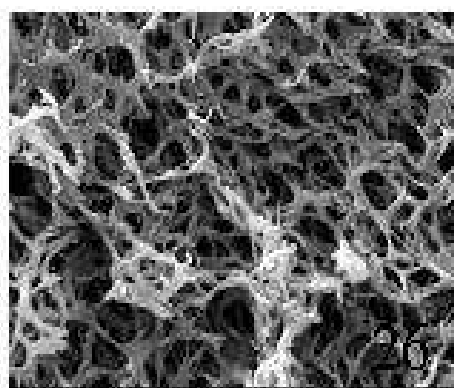


Figura 26. Biofilme *F. nucleatum* com NaOCl 2,5%-com agitação

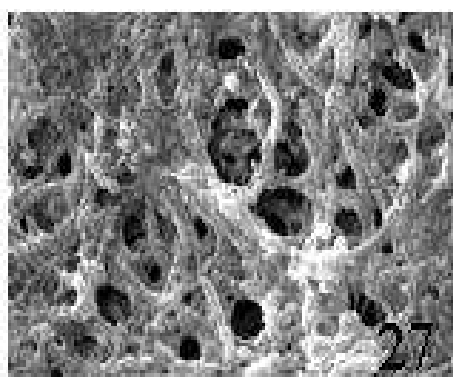


Figura 27. Biofilme *F. nucleatum* com clorexidina gel 2%-com agitação

Tabela 41. Manutenção da estrutura do biofilme de *C. albicans* após contato com as substâncias químicas auxiliares testadas - com agitação.

tempo	CLX Gel 2%	NaOCl 2,5%	NaOCl 5,25%
30s	+	-	-
5 min	+	-	-
10 min	+	-	-
15 min	+	-	-
30 min	+	-	-
60 min	+	-	-

Tabela 42. Manutenção da estrutura do biofilme de *C. albicans* após contato com as substâncias químicas auxiliares testadas - sem agitação.

tempo	CLX Gel 2%	NaOCl 2,5%	NaOCl 5,25%
30s	+	+	-
5 min	+	-	-
10 min	+	-	-
15 min	+	-	-
30 min	+	-	-
60 min	+	-	-

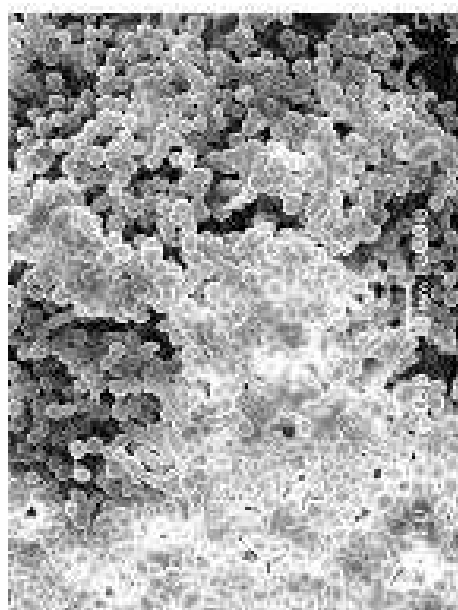


Figura 24. Biofilme *C. albicans*

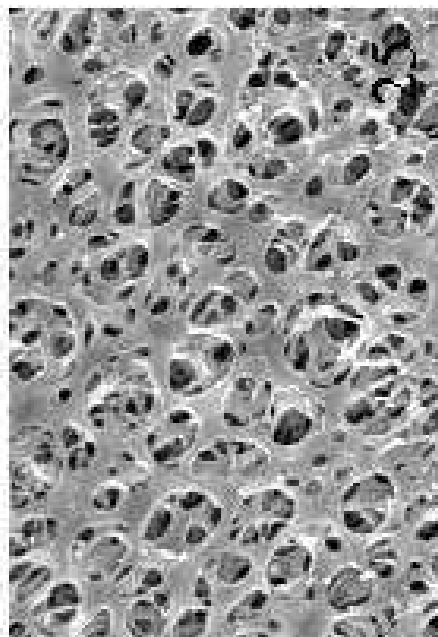


Figura 25. Biofilme *C. albicans* com NaOCl 2,5% - sem agitação

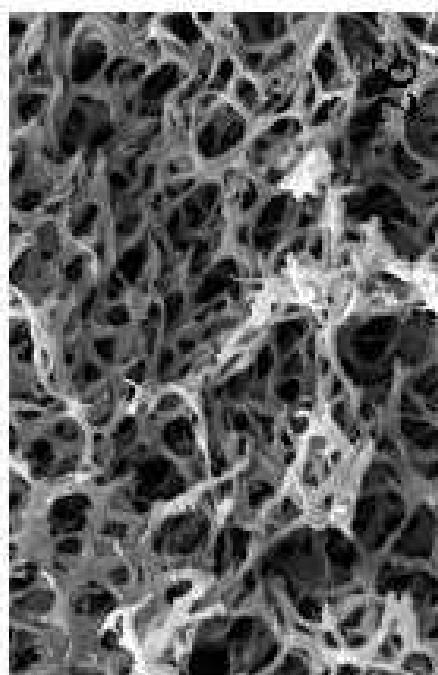


Figura 26. Biofilme *C. albicans* com NaOCl 2,5% - com agitação

Tabela 43. Manutenção da estrutura do biofilme de *E. faecalis* após contato com as substâncias químicas auxiliares testadas - com agitação.

tempo	CLX	Gel 2%	NaOCl 2,5%	NaOCl 5,25%
30s		+	-	-
5 min		+	-	-
10 min		+	-	-
15 min		+	-	-
30 min		+	-	-
60 min		+	-	-

Tabela 44. Manutenção da estrutura do biofilme de *E. faecalis* após contato com as substâncias químicas auxiliares testadas - sem agitação.

tempo	CLX	Gel 2%	NaOCl 2,5%	NaOCl 5,25%
30s		+	+	-
5 min		+	+	-
10 min		+	-	-
15 min		+	-	-
30 min		+	-	-
60 min		+	-	-



Figura 31. Biofilme *E. faecalis*

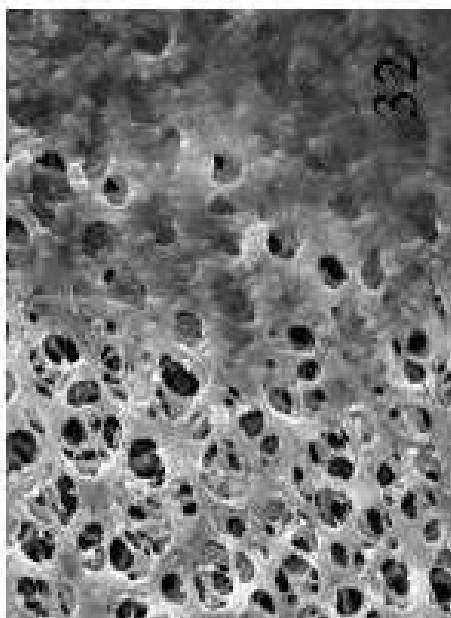


Figura 32. Biofilme *E. faecalis* com NaOCl 2,5%- sem agitação

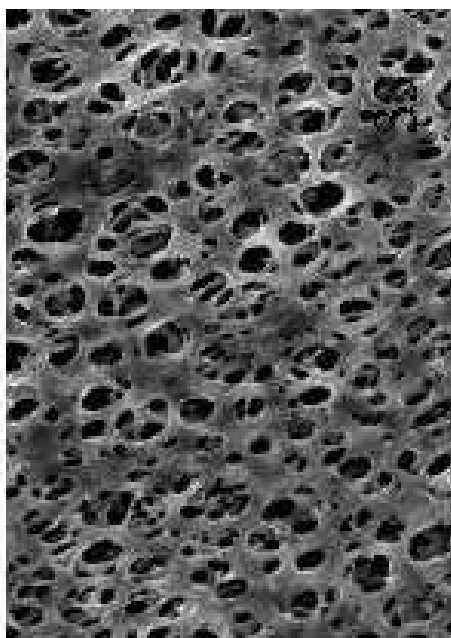


Figura 33. Biofilme *E. faecalis* com NaOCl 2,5%- com agitação

Tabela 45. Manutenção da estrutura do biofilme de *S. aureus* após contato com as substâncias químicas auxiliares testadas - com agitação.

tempo	CLX	Gel 2%	NaOCl 2,5%	NaOCl 5,25%
30s		+	-	-
5 min		+	-	-
10 min		+	-	-
15 min		+	-	-
30 min		+	-	-
60 min		+	-	-

Tabela 46. Manutenção da estrutura do biofilme de *S. aureus* após contato com as substâncias químicas auxiliares testadas - sem agitação.

tempo	CLX	Gel 2%	NaOCl 2,5%	NaOCl 5,25%
30s		+	-	-
5 min		+	-	-
10 min		+	-	-
15 min		+	-	-
30 min		+	-	-
60 min		+	-	-

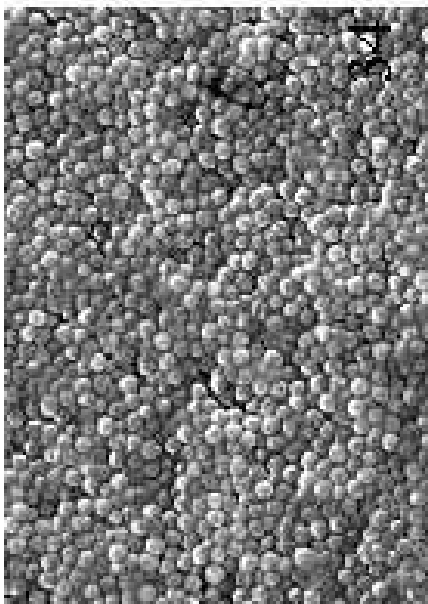


Figura 34. Biofilme *S. aureus*

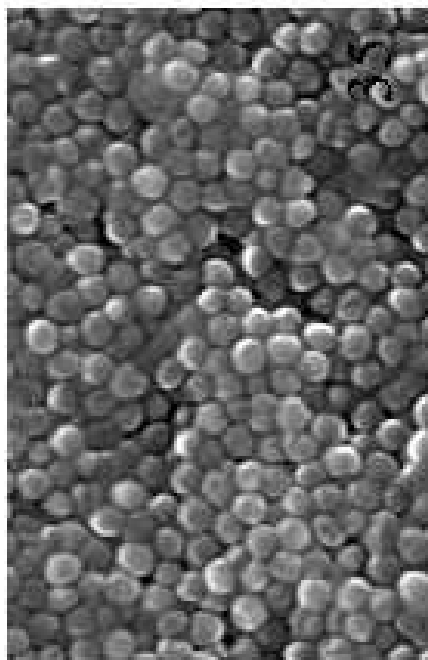


Figura 35. Biofilme *S. aureus*

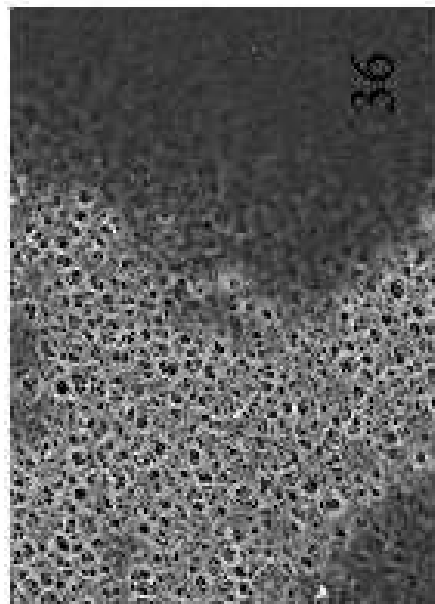


Figura 36. Biofilme *S. aureus* com clorexidina gel 2%-com agitação

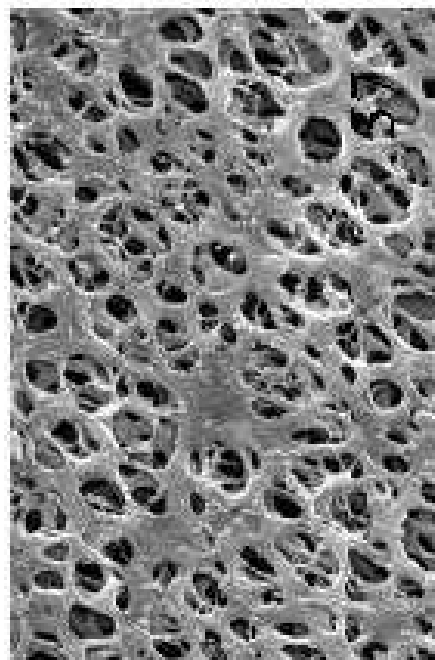


Figura 37. Biofilme *S. aureus* com NaOCl 2,5%-com agitação

2. Membrana de nitrato de cellulose - Whatman International Ltd, Maidstone,UK).

2.1. *Descrição.*

Membrana de nitrato de celulose que favorece a formação do biofilme sobre a placar de Agar sangue. Porosidade: 0,2µm; diâmetro:13 mm.

3. Meios de cultura

3.1. *Fastidious Anaerobe Agar (FAA) – LAB M (Bury, UK)*

3.1.1. Descrição

Meio capaz de favorecer o crescimento dos anaeróbios isolados clinicamente. As peptonas são incorporadas para a máxima estimulação de crescimento. Amido e bicarbonato atuam como agentes desintoxicantes, enquanto a hemina favorece a produção de pigmento nos “*Bacteroides*” produtores de pigmento preto. Vitamina K e succinato de sódio fornecem fatores essenciais de crescimento para alguns anaeróbios, como também 0,1% de glicose. O nível baixo de glicose impede a produção de níveis elevados de ácidos e álcoois que podem inibir o crescimento bacteriano.

3.1.2. Preparo

Adicionar 23,0 g do pó em 500 ml de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 min. e depois agitada. É esterilizada por autoclavagem a 121°C por 15 min e resfriada a 47 °C. Então adicionar assepticamente 5% de sangue de carneiro desfibrinado, misturar bem e distribuir nas placas de petri.

3.1.3. Aparência

Vermelho devido à adição de sangue. O meio fica escuro (reduzido) mais tarde devido à adição de redutores.

3.1. 4. Armazenagem

Placas: até 7 dias a 4 °C no escuro.

3. 1.5. Inoculação

Em superfície.

3. 1.6. Incubação

37 °C anaerobicamente, por períodos de 48 horas e 7 dias.

3. 1.7. Fórmula

	g/L
Mistura de peptonas	23,0
Cloreto de sódio	5,0
Amido	1,0
Agar no. 2	12,0
Glicose	0,4
Piruvato de sódio	1,0
HCL cisteína monoidratada	1,0
Hemina	0,5
Vitamina K	0,001
L-arginina	1,0
Pirofosfato solúvel	0,25
Succinato de sódio	0,5
pH: 7,4 ± 0,2	

3.2. Fastidious Anaerobe Broth (FAB) - LAB M (Bury, UK)

3.2.1. *Descrição*

Meio de cultura líquido capaz de favorecer o crescimento de bactérias anaeróbias e facultativas. As peptonas são incorporadas para a máxima estimulação de crescimento. Vitamina K, hemina e L-cisteína são também fatores de crescimento para alguns anaeróbios. L-cisteína e tioglicolato de sódio reduzem o Eh (redox) do meio e o ágar inibe a absorção do oxigênio.

3.2. 2. *Preparo*

Dispensar 14,85g do pó em 500 mL de água deionizada. A mistura é dispensada em tubos que são deixados semiabertos durante a esterilização, que é feita por autoclavagem a 121°C por 15 min. Os tubos são fechados o mais rápido possível após a autoclavagem.

3.2.3. *Aparência*

Amarelo claro.

3.2.4. *Armazenagem*

Em tubos com tampas, até 3 meses a 15-20°C no escuro.

3.2.5. *Inoculação*

Se usado como meio de cultura com sangue, uma diluição mínima de 1:10 deve ser usada.

3.2.6. *Incubação*

37 °C por 24-72 horas. Tubos bem fechados.

3.2.7. *Fórmula*

	g/L
Mistura de peptonas	15,0
Cloreto de sódio	2,5
Extrato de levedura	1,0
Agar no. 1	0,75
L-cisteína	0,5
Hemina	0,005
Vitamina K	0,005
Resazurina	0,001
Bicarbonato de sódio	0,4
pH: 7,4 ± 0,2	

3.3. Brain Heart Infusion Agar (BHI) – LAB M (Bury, UK)

3.3. 1. Descrição

Este meio foi desenvolvido inicialmente para o isolamento de patógenos orais. Com a adição de 5% de sangue desfibrinado, este meio permite o crescimento da maioria dos microrganismos fastidiosos. O fosfato tamponado ajuda neutralizar os ácidos produzidos pela utilização da glicose mantendo a viabilidade dos microrganismos. Este meio não é recomendado para a determinação das reações hemolíticas porque contém glicose em sua composição.

3.3. 2. Preparo

Adicionar 24.5 g do pó em 500 ml de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 min. e depois agitada. É esterilizada por autoclavagem a 121°C por 15 min e resfriada a 47 °C antes de distribuir sobre as placas. Caso deseje adicionar assepticamente 5% de sangue de carneiro desfibrinado, misturar bem e distribuir nas placas de petri.

3.3.3. Aparência

Amarelo claro (sem a adição de sangue) ou vermelho devido à adição de sangue.

3.3.4. Armazenagem

Placas: até 7 dias a 4 °C no escuro.

3.3.5. *Inoculação*

Em superfície.

3.3.6. *Incubação*

Tempo e temperatura para cada microrganismo.

3.3.7. *Fórmula*

	g/L
Infusão de sólidos de cérebro e coração	17,5
Proteose petona	10,0
Glicose	2,0
Cloreto de sódio	5,0
Fosfato di-sódico	2,5
Ágar nº 2	12,0
pH: 7,4 ± 0,2	

3.4. Brain Heart Infusion Broth (BHI) – LAB M (Bury, UK)

3.4.1. Descrição

Meio de infusão isotônico rico em triptose (uma mistura de carne e petonas do leite) promovendo uma ampla gama de substratos. Uma concentração baixa de glicose é utilizada para estimular o crescimento precoce. É ligeiramente tamponado para impedir a morte rápida de algumas espécies devido a produção de ácido.

3.4.2. Preparo

Dispensar 18,5 g do pó em 500 mL de água deionizada. A suspensão deve ficar em repouso por 10 minutos e depois dissolvida sob aquecimento brando antes de ser dispensada em tubos que são deixados semiabertos durante a esterilização. A esterilização é feita por autoclavagem a 121°C por 15 min. Os tubos são fechados o mais rápido possível após a autoclavagem.

3.4.3. Aparência

Amarelo claro.

3.4.4. Armazenagem

Em tubos com tampas, até 3 meses a 15-20 °C no escuro.

3.4.5. *Inoculação (como meio de cultura para sangue)*

Usar um volume mínimo de 50 ml de meio e adicionar sangue numa diluição de 1:10 a 1:20. Usar em conjunto com um meio de cultura anaeróbico.

3.4.6. *Incubação*

37 °C aerobicamente até 15 dias.

3.4.7. *Fórmula*

	g/L
Infusão de sólidos de cérebro de boi	12,5
Infusão de sólidos de coração	5,0
Proteose peptona	10,0
Glicose	2,0
Cloreto de sódio	5,0
Fosfato di-sódico	2,5
pH: 7,4 ± 0,2	

4. Soluções neutralizadoras (Siqueira *et al.* 1998)

As soluções neutralizadoras foram utilizadas nos testes com a finalidade de neutralizar as ações residuais dos irrigantes ou medicações nos experimentos que utilizaram o método do contato direto.

4.1. Neutralizadores da clorexidina

0,5 % de Tween 80 e 0,07 % de lecitina de soja

4.1.1. Preparo

Previamente à esterilização, deve-se adicionar 0,5 g de Tween 80 (Polyoxyethylene-sorbitan monooleate, Sigma, Chemical, St. Louis, USA) e 0,07 g de lecitina de soja (Proderma Farmácia de Manipulação Ltda., Piracicaba, SP, Brasil) em 100 ml de meio de cultura em caldo. A suspensão deve ficar em repouso por 10 minutos e depois ser dissolvida sob aquecimento brando antes de ser dispensada em tubos que são deixados semiabertos durante a esterilização. A esterilização é feita por autoclavagem a 121°C por 15 min. Os tubos são fechados o mais rápido possível após a autoclavagem.

4.2. Neutralizador do Hipoclorito de Sódio

0,6 % de tiosulfato de sódio

4.2.1. *Preparo*

Previamente à esterilização, deve-se adicionar 0,6 g de tiosulfato de sódio (Chemco Industrial e Comércio Ltda., Campinas, SP, Brasil) em 100 ml de meio de cultura em caldo. A suspensão deve ficar em repouso por 10 minutos e depois ser dissolvida sob aquecimento brando antes de ser dispensada em tubos que são deixados semiabertos durante a esterilização. A esterilização é feita por autoclavagem a 121°C por 15 min. Os tubos são fechados o mais rápido possível após a autoclavagem.

5. Câmara de anaerobiose (Don-Whitley Scientific, Barford, U.K.)

A câmara de anaerobiose consiste em uma câmara de incubação, feita de resina acrílica e tem a capacidade de armazenar placas de petri de até 180 x 90 mm. O acesso à cabine feito através de portas com luvas de borracha.

Um controlador de temperatura digital indica e mantém uma temperatura constante no interior da cabine.

A cabine utiliza o sistema “Anotox” e o catalisador Palladium Deoxo “D” para manter anaerobiose estrita dentro da cabine e evitar a formação de metabólitos voláteis tóxicos. A função do “Anotox” é purificar a atmosfera pela remoção de ácidos graxos voláteis e hidrogênio sulfúrico da atmosfera. A função do catalisador Palladium Deoxo “D” é catalisar rastros de oxigênio dentro da câmara via hidrogênio, o qual também está dentro da câmara. O vapor de água produzido pelo catalisador é removido automaticamente por um sistema de controle de umidade. O catalisador Palladium Deoxo “D” e o “Anotox” devem ser trocados uma vez por ano no serviço de manutenção. Se eles ficarem muito úmidos durante o uso, devem ser removidos e secados. O “Anotox” que é feito de material plástico deve ser seco numa incubadora com temperatura de 37°C – 60°C por algumas horas. O sachê catalisador que é feito de aço inoxidável deve ser seco em forno a 160°C por uma ou duas horas.

O controle de anaerobiose no interior da cabine é feito com uma solução de azul de metileno ou outro indicador de redução de oxigênio.

A cabine apresenta um controle de umidade que permite que qualquer excesso de umidade condensado nas placas seja canalizado para fora da câmara.

A iluminação na cabine é feita por luzes fluorescentes.

6. Dados de \log_{10}

Dados de $\log_{10}(\text{tempo})$

Tratamentos Microrganismos		Sem agitação	Com agitação
1	1	1,4843	1,4843
1	2	1,4843	1,4843
1	3	1,4843	1,4843
1	4	1,4843	1,4843
1	5	2,9545	3,2554
1	6	2,4778	3,2554
1	7	2,7785	3,5564
2	1	1,4843	1,4843
2	2	1,4843	1,4843
2	3	1,4843	1,4843
2	4	1,4843	1,4843
2	5	1,4843	2,4778
2	6	1,4843	1,4843
2	7	1,4843	1,4843
3	1	1,4843	1,4843
3	2	1,4843	1,4843
3	3	1,4843	1,4843
3	4	1,4843	1,4843
3	5	2,4778	2,4778
3	6	1,4843	3,5564
3	7	2,4778	1,4843
4	1	1,4843	1,4843
4	2	1,4843	1,4843
4	3	1,4843	1,4843
4	4	1,4843	1,4843
4	5	1,4843	1,4843
4	6	1,4843	1,4843
4	7	1,4843	1,4843

Tratamentos:

- 1 – CLX gel 2%
- 2 – CLX liq 2%
- 3 – NaOCl 2,5%
- 4 – NaOCl 5,25%

Microrganismos: 1 – Pi
 2 – Pe
 3 – Pg
 4 – Fn
 5 – Ca
 6 – Ef
 7 – Sa

Análise de Variância em blocos ao acaso (Two-way ANOVA)

Log₁₀ (tempo): com agitação

Fonte de Variação	DF	Somas de Quadrados	Quadrados Médios	F	p-valor
Tratamentos	3	1,403	0,468	3,62	0,033
Microrganismos	6	1,894	0,316	2,45	0,066
Resíduo	18	2,322	0,129		
Total	27	5,619			

Log₁₀ (tempo): sem agitação

Fonte de Variação	DF	Somas de Quadrados	Quadrados Médios	F	p-valor
Tratamentos	3	2,645	0,882	2,69	0,077
Microrganismos	6	4,955	0,826	2,52	0,060
Resíduo	18	5,894	0,327		
Total	27	13,493			